
**Molekulare Mechanismen kutaner humaner Papillomviren (HPV) während
der Hautkarzinogenese**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin**

von

Diplom-Biologin **Kathi Westphal**

aus Teterow, geb. am 09.05.1978

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Detlef H. Krüger
2. PD Dr. rer. nat. habil Ingo Nindl
3. Prof. Dr. rer. nat. Frank Rösl

Tag der Abgabe: 04. September 2008

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Juli 2009

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Zusammenfassung.....	1
summary	2
1 <i>Einleitung</i>.....	3
1.1 Das Mehrstufenmodell der Karzinogenese	3
1.2 Aufbau der menschlichen Haut.....	4
1.3 Organotypische Hautmodelle.....	5
1.4 Nicht-melanozytäre Hauttumore (NMSC).....	6
1.5 UV-Strahlung und Karzinogenese	6
1.6 Humane Papillomviren (HPV).....	7
1.7 HPV Genomorganisation und Replikationszyklus.....	8
1.8 HPV Virusproteine E6 und E7	10
1.9 HPV und NMSC.....	13
1.10 Ziel der vorliegenden Arbeit	14
2 <i>Material & Methoden</i>.....	15
2.1 Material	15
2.1.1 Patientenproben.....	15
2.1.2 Eukaryonte Zelllinien und Kulturmedien.....	15
2.1.3 Bakterienstämme und Nährmedien	16
2.1.4 Plasmide und Oligonukleotide	17
2.1.5 Antikörper und Enzyme	20
2.1.6 DNA- und Protein-Größenstandards.....	23
2.1.7 Reagenzien	23
2.1.8 Puffer und Lösungen	24
2.1.9 Verbrauchsmaterial	27
2.1.10 Kommerzielle Kits	28
2.1.11 Geräte	28
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	29
2.2.1 Transformation kompetenter Bakterien	29
2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	29
2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	30
2.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	30
2.2.5 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	30
2.2.6 Dephosphorylierung von DNA	31
2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA.....	31
2.2.8 Klonierung kutaner E6 oder E7 ORF in den retroviralen Vektor pLXSN.....	31
2.2.9 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zellen	33
2.2.10 Reverse Transkription mit anschließender Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	33
2.2.11 hTERT-PCR.....	34
2.2.12 Mykoplasmen-PCR	35

2.3	Zellbiologische Methoden.....	36
2.3.1	Kultivierung eukaryonter Zelllinien.....	36
2.3.2	Isolierung von HPK und HPF aus Hautgewebe.....	37
2.3.3	Kultivierung von HPK.....	38
2.3.4	Bestrahlung humaner Zelllinien.....	39
2.3.5	Herstellung rekombinanter Retroviren mit dem Retro X-System.....	39
2.3.6	Infektion von HPK mit rekombinanten Retroviren.....	41
2.3.7	Langzeitkultur zur Immortalisierung infizierter HPK.....	42
2.3.8	Invasionstest mit infizierten HPK.....	42
2.3.9	Organotypische Hautkulturen („raft-culture“) mit infizierten HPK.....	44
2.4	Proteinchemische Methoden.....	45
2.4.1	Präparation von Gesamtzellextrakten.....	45
2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	45
2.4.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
2.4.4	Western Blot-Analyse.....	46
2.4.5	Immunhistochemische Untersuchungen.....	46
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Untersuchungen zur HPV E6 oder E7 Expression in HPK.....	49
3.1.1	E6 oder E7 RNA wird in infizierten HPK exprimiert.....	49
3.1.2	Das E6 oder E7-Protein wird in infizierten HPK exprimiert.....	50
3.2	Funktionelle Untersuchungen mit HPV E6 oder E7 infizierten HPK.....	51
3.2.1	Die Expression von E6 oder E7 verlängert die Lebensspanne in HPK.....	51
3.2.2	Mit HPV 8 E6 infizierte HPK exprimieren hTERT.....	53
3.2.3	Mit E6 oder E7 infizierte HPK sind nicht invasiv.....	54
3.2.4	Bak wird nach UV-B-Bestrahlung in E6 infizierten HPK nicht degradiert.....	56
3.3	Organotypische Hautkulturen.....	57
3.3.1	Etablierung organotypischer Hautkulturen mit E7 infizierten HPK.....	57
3.3.2	Die Histologie ist in E7-Hautkulturen verändert.....	58
3.3.3	Die Differenzierung ist mit HPV 1 E7, HPV 4 E7 und HPV 38 E7 verändert.....	60
3.3.4	Die Proliferation der HPK ist in E7-Hautkulturen erhöht.....	62
3.3.5	Der Zellzyklus ist mit HPV 5 E7 oder HPV 8 E7 verändert.....	64
3.3.6	Die Expression von Tenascin-C ist erhöht mit HPV 4 E7, HPV 8 E7, HPV 38 E7 und RTRX7 E7.....	66
3.3.7	Zusammenfassung der beobachteten Effekte in HPV E7-Hautkulturen.....	67
4	Diskussion.....	68
4.1	Untersuchungen von HPV E6 oder E7 infizierten HPK.....	68
4.1.1	Verlängerte Lebensspanne und h-TERT Expression in E6 oder E7 infizierten HPK.....	69
4.1.2	Bak Degradation nach UV-B-Bestrahlung in HPV E6 infizierten HPK.....	70
4.2	Untersuchungen HPV E7 infizierter HPK in organotypischen Hautmodellen.....	71
4.2.1	Histologie, Proliferation und Differenzierung HPV E7 infizierter HPK in organotypischen Hautmodellen.....	72
4.2.2	Übergehen des p16 ^{INK4a} induzierten Zellzyklusstops in E7 infizierten HPK in organotypischen Hautmodellen.....	73
4.2.3	Invasives Potential HPV E7 infizierter HPK in organotypischen Hautmodellen – Tenascin-C als potentieller Marker für Invasion.....	74
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick.....	75

5	<i>Literaturverzeichnis</i>	77
Anhang	90
i Tabellenverzeichnis	90
ii Abbildungsverzeichnis	91
iii Abkürzungsverzeichnis	92
Danksagung	94
Publikationen	95
Tagungsbeiträge	95
Eidesstattliche Erklärung	96

Zusammenfassung

In den letzten Jahren gab es durch epidemiologische und molekularbiologische Studien vermehrt Hinweise, dass kutane humane Papillomviren (HPV) ursächlich an der Entstehung nicht-melanozytärer Hauttumore (*engl.* NMSC) beteiligt sind. Mukosale HPV sind verglichen mit kutanen Typen besser charakterisiert und stellen das kausale Agens für Gebärmutterhalskrebs (Karzinom der *Zervix uteri*) dar. Die Expression der viralen Onkogene E6 und E7 mukosaler Hochrisiko-HPV-Typen ist für die Initiation und Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps in Zervixkarzinomen essentiell. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung molekularer Mechanismen der viralen Proteine E6 und E7 kutaner HPV-Typen.

Die E6 oder E7 Gene der verschiedenen HPV-Typen 1, 4, 5, 8, 20, 38 und RTRX7, welche *in vivo* mit kutanen benignen oder malignen Läsionen assoziiert sind, wurden untersucht. Natürliche Wirtszellen dieser Viren, humane primäre Keratinozyten (HPK) der Haut, wurden mit rekombinanten, für E6 oder E7 kodierenden Retroviren infiziert. Die Analysen erfolgten in Monolayer-Kultur (undifferenzierte Keratinozyten) oder in organotypischen Hautmodellen (Induktion der Keratinozytendifferenzierung).

Die Expression von E6 oder E7 führte in Monolayer-HPK zu einer Verlängerung der Lebensspanne und zu einer deutlich erhöhten Verdoppelungsrate. Eine Telomeraseaktivierung, die charakteristisch für immortale Zellen ist, wurde nur in HPV 8 E6 positiven HPK nachgewiesen. In organotypischen Hautmodellen induzierte das E7 Protein von HPV 1, 4 und 38 starke Veränderungen in der Differenzierung sowie eine Zunahme der Proliferation. Weiterhin wurde eine Aufhebung der normalen Zellzykluskontrolle in suprabasalen HPV 5 E7 oder HPV 8 E7 beobachtet. Hinweise auf ein starkes invasives Potential von E7-infizierten HPK wurden für HPV 8 E7 bestätigt und für HPV 4 E7, HPV 38 E7 und RTRX7 E7 erweitert.

Molekulare Mechanismen der viralen Gene E6 und E7 kutaner HPV unterscheiden sich von mukosalen Typen. Das Mehrstufenmodell der Karzinogenese beinhaltet eine Reihe fundamentaler Zelltransformationen, die für eine Tumorgenese nötig sind. In dieser Arbeit beschriebene Mechanismen der Modulation der Zelldifferenzierung und Zellproliferation durch die kutanen HPV-Typen 4, 5, 8 und 38 können unter Umständen zur Induktion und Progression früher Stadien von Plattenepithelkarzinomen (SCC) beitragen.

summary

In the last years epidemiologic and molecular biological studies accumulated increasing evidence that cutaneous human papillomaviruses are etiologically involved in the formation of non-melanoma skin cancer (NMSC). Mucosal HPV types are better characterised compared to cutaneous types and they are the causative agent for cervical cancer (carcinoma of the *Zervix uteri*). Essentiell for the initiation and maintenance of the transformed phenotype in cervix carcinoma is the expression of the viral oncogenes E6 and E7 of the mucosal high-risk HPV types. The presented work aims to identify the underlying molecular mechanisms of the viral proteins E6 and E7 of cutaneous HPV types.

The E6 and E7 genes of the different HPV types 1, 4, 5, 8, 20, and RTRX7, which are *in vivo* associated with cutaneous benign or malignant lesions, were studied. Natural host cells of these viruses, human primary keratinocytes (HPK) of the skin, were infected with recombinant E6 and E7 encoding retroviruses. The following analyses were performed in monolayer culture (non-differentiated keratinocytes) or in organotypic skin culture (induction of keratinocyte differentiation).

The expression of E6 and E7 elongated the life span of monolayer HPK and significantly increased the doubling rate. An activation of the telomerase, characteristic for immortalized cells, was only detected in HPV 8 E6 positive cells. In organotypic skin cultures E7 of HPV 1, 4 and 38 induced drastic changes in differentiation and proliferation. Additionally an impairment of the normal cell cycle control in suprabasale HPV 5 E7 and 8 E7 cultures was seen. Hints for a strong invasive potential of E7 infected HPK were proven for HPV 8 E7 and expanded to HPV 4 E7, HPV 38 E7 and RTRX E7.

The viral E6 and E7 genes of cutaneous and mucosal HPV types exhibit different molecular mechanisms. The multistep model of carcinogenesis includes a series of fundamental cell transformations necessary for tumorigenesis. Mechanisms for the modulation of cell differentiation and proliferation by cutaneous HPV types 4, 5, 8 and 38 described in this work could potentially contribute to the induction and progression of early stages of squamous cell carcinoma.

1 Einleitung

1.1 Das Mehrstufenmodell der Karzinogenese

Den mehrstufigen Übergang von normalen, in ihrer Proliferation kontrollierten Zellen, zu unkontrolliert wachsenden Tumorzellen bezeichnet man als Transformation. Dabei akkumulieren genetische Veränderungen (Mutationen) nach und nach in normalen Körperzellen und können zur Entwicklung von Tumoren (Karzinogenese, Krebsentstehung) führen. Transformierte Zellen zeigen *in vitro* Merkmale wie das Umgehen des programmierten Zelltods (Apoptose), unbeschränkte Teilungsfähigkeit oder invasives Wachstum (Hanahan und Weinberg, 2000). Viren können über unterschiedliche Mechanismen zu Transformation und Karzinogenese beitragen, etwa durch Immunsuppression, durch die Integration des viralen Genoms oder durch die Expression ihrer Gene. Sind virale Gene an zellulären Transformationsprozessen beteiligt, werden diese als Onkogene bezeichnet.

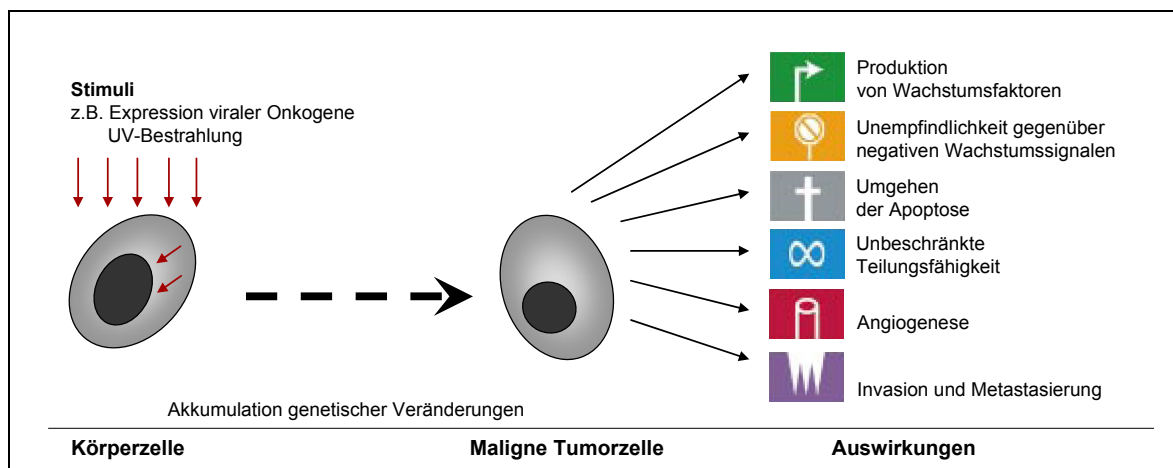


Abbildung 1.1: Mehrstufiges Karzinogenesemodell nach Hanahan und Weinberg (2000).

Normale Körperzellen akkumulieren genetische Veränderungen, die durch externe oder interne Stimuli ausgelöst werden (rote Pfeile). In einem mehrstufigen Prozess können so maligne Tumorzellen entstehen, die beispielsweise die Apoptose umgehen oder metastasieren.

Nach Angaben der *World Health Organization* (WHO) resultieren 15%-20% aller Tumorerkrankungen des Menschen aus chronischen Virusinfektionen (Parkin et al., 2005). Beispielsweise sind DNA-Viren wie das Epstein Barr Virus (EBV), das Hepatitis B Virus (HBV) oder das Humane Herpes Virus 8 (HHV-8) mit Lymphomen, dem Leberzellkarzinom sowie dem Kaposi Sarkom assoziiert (Elgui de, 2007). Humane Papillomviren (HPV) Typ 16 und 18 sind ursächlich an der Entstehung von Gebärmutterhalskrebs (Zervixkarzinom) beteiligt (IARC 1995, zur Hausen, 1987). In den letzten Jahren wird überdies zunehmend eine

Beteiligung von HPV an der Karzinogenese der Haut diskutiert, worauf im Weiteren ausführlich eingegangen wird.

1.2 Aufbau der menschlichen Haut

Die menschliche Haut besteht aus mehreren Schichten. Makroskopisch lassen sich Epidermis, Dermis und subkutanen Fettgewebe unterscheiden. Epidermis und Dermis bilden zusammen die Kutis. Die Epidermis ist ein klassisches Proliferationsgewebe, welches stetiger Erneuerung und Differenzierung unterliegt (Junqueira et al., 1996). Sie ist etwa 100 µm dick und wird von der Dermis durch die Basalmembran abgegrenzt. In die Dermis ragende epidermale Fortsätze werden als Reteleisten bezeichnet. Die kutane Epidermis ist aus vier Schichten (*Strata*) aufgebaut, dem *Stratum basale* (Basalzellschicht), *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht), *Stratum granulosum* (Körnerzellschicht) und *Stratum corneum* (Hornschicht; Abbildung 1.2).

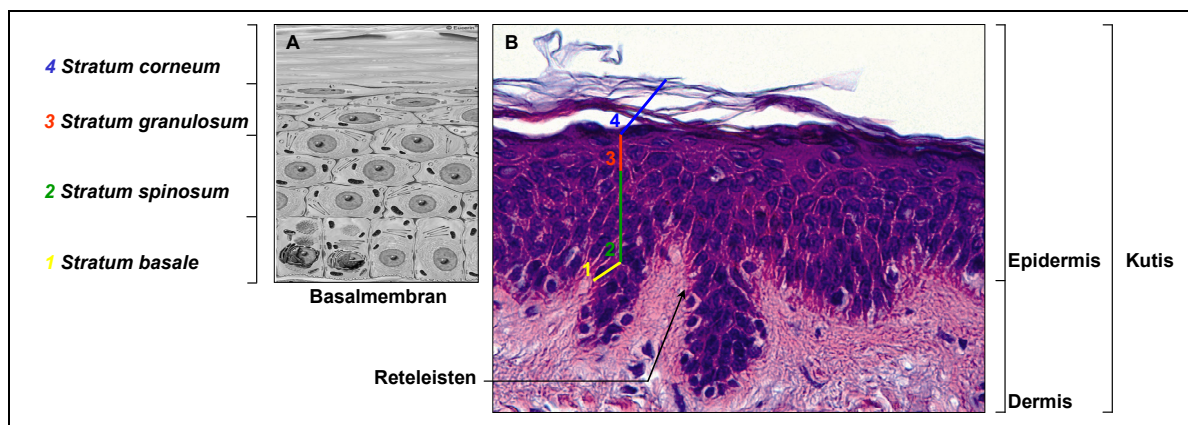


Abbildung 1.2: Aufbau der menschlichen Haut.

(A) Schematische Darstellung der Epidermis, die sich aus Stratum basale (1), Stratum spinosum (2), Stratum granulosum (3) und Stratum corneum (4) zusammensetzt (entnommen aus www.eucerin.de). (B) Histologie der Haut (Lokalisation: Handrücken eines 75-jährigen Patienten; HE-Färbung, Vergrößerung x200). Die verschiedenen Strata der Epidermis sind ebenfalls mit 1-4 bezeichnet. Eine typische Differenzierung der Keratinozyten und die Reteleisten sind zu erkennen.

Die Hauptzellpopulation in der Epidermis bilden mit etwa 90% die Keratinozyten. Diese Bezeichnung basiert auf der Fähigkeit der Zellen, Zytokeratin (engl. *cytokeratin*, CK) zu synthetisieren. CK stellen eine Gruppe wasserunlöslicher Filamentproteine (Intermediärfilamente) dar, die Hauptbestandteil des Zytoskeletts von Keratinozyten sind (Moll et al., 1982). Bisher sind 54 verschiedene humane CK charakterisiert, die abhängig vom Differenzierungsgrad des jeweiligen Epithels spezifisch, zumeist paarweise exprimiert werden (Moll et al., 2008; Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Charakteristisches Expressionsmuster ausgewählter Zytokeratine in der differenzierten, kutanen Epidermis (nach Moll et al., 2008)

Zytokeratine	CK 5 & CK 14	CK 15	CK 1 & CK 10
Expression	Vorrangig basale Zellschichten	Basale Zellschichten	Suprabasale Zellschichten

CK, Zytokeratin

Die Differenzierung der Keratinozyten ist mit morphologischen sowie histochemischen Zellveränderungen verbunden. Ausgehend vom proliferativ aktiven *Stratum basale* durchlaufen die Keratinozyten, innerhalb von etwa 28 Tagen, die einzelnen Schichten der Epidermis. Im Zuge der Differenzierung erfolgen die Deformierung der Keratinozyten, eine Abplattung der Zellen sowie die Auflösung von Zellkernen und Zellorganellen. Durch Dehydrierung und die Ausbildung des sogenannten „*cornified envelope*“ (einem zellulären, stabilisierenden Komplex verschiedener Proteine, wie beispielsweise Involucrin) kommt es schließlich zur Verhornung der oberen Hautschicht (Steinert und Marekov, 1995). Abschließend werden die Keratinozyten als zellkernlose und zytokeratinreiche sogenannte Korneozyten in der äußersten Schicht, dem *Stratum corneum*, abgeschilfert.

1.3 Organotypische Hautmodelle

Um Zellen *in vitro* in einem differenzierten Epithel zu untersuchen und sich damit der *in vivo* Situation der humanen Haut möglichst anzunähern, werden organotypische Hautmodelle („*raft-culture*“) etabliert. Die Grundlage dieser Modelle sind Untersuchungen von Prunieras et al. (1983) zur Kultivierung epidermaler Zellen auf einer Kollagenmatrix und zur Differenzierungsinduktion. So erhaltene Hautäquivalente weisen große histologische Ähnlichkeit mit dem Originalgewebe auf (Regnier et al., 1992; Zieske et al., 1994; Poumay et al., 2004). Das in dieser Arbeit verwendete organotypische Hautmodell besteht aus dermalen Komponenten sowie humanen primären Keratinozyten (HPK). Durch eine Induktion der Keratinozytendifferenzierung an der Luft-Medium-Grenze wird eine mehrschichtige Epidermis, ähnlich der natürlichen humanen Haut gebildet (Bell et al., 1983). So wird im Vergleich zu einschichtig wachsenden Zellen eine komplette Differenzierung der Keratinozyten erreicht. Aufgrund der Ausprägung gewebespezifischer Marker, wie verschiedener Zytokeratine und histologisch typischer Strukturen wie einem *Stratum corneum* werden organotypische Hautkulturen als *in vitro* Modelle eingesetzt (Asbill et al., 2000; Specht et al., 1998). So kann beispielsweise der Einfluß ausgewählter viraler Onkogene auf die Transformation von Keratinozyten und, daraus schlussfolgernd, auf die Progression von Hauttumoren untersucht werden.

1.4 Nicht-melanozytäre Hauttumore (NMSC)

Nicht-melanozytäre Hauttumore (engl. *non-melanoma skin cancer*, NMSC) sind in der Bevölkerung kaukasischen Ursprungs die häufigsten Hautkrebsformen (Pfister, 2003). NMSC umfassen Basalzellkarzinome (engl. *basal cell carcinoma*, BCC) und Plattenepithelkarzinome (engl. *squamous cell carcinoma*, SCC, Stachelzellkarzinom). Die Inzidenz (Anzahl der Neuerkrankungen) hat sich während der letzten Dekade fortwährend erhöht und macht derzeit ungefähr 30% aller Krebserkrankungen aus (Miller und Weinstock, 1994; DePinho, 2000; Diepgen und Mahler, 2002). In Mitteleuropa wurde für SCC eine Inzidenz von etwa 20-30 und für BCC von etwa 100 pro 100.000 Einwohnern in den 90er Jahren ermittelt (Hausschild et al., Breuninger et al. JDDG 2008). Sonnenlichtexposition gilt als wichtigster ätiologischer (ursächlicher) Risikofaktor für die Entstehung von NMSC. In den folgenden Betrachtungen wird ausschließlich auf SCC eingegangen.

Kutane SCC entstehen häufig aus Präkanzerosen und präinvasiven malignen Vorstufen (Marks et al., 1988). Wichtig ist hier vor allem die Aktinische (solare) Keratose (AK), ein durch chronische kumulative Sonnenlichtexposition induziertes, intraepidermales Karzinom (*Carcinoma in situ*, „Krebs in Entstehung“; Breuninger et al. JDDG 2008). Es ist histologisch durch starke Zell- und Kernatypien gekennzeichnet. Die Prävalenz (Häufigkeit einer Erkrankung) von AK wird ab einem Alter von über 50 Jahren auf bis zu 40% geschätzt (Salasche, 2000). AK können nach langer Bestandsdauer in SCC übergehen, histologisch beginnend mit der Aufhebung der normalen Differenzierung der Epidermis und der verstärkten Entwicklung zellulärer Dysplasien (Breuninger et al. JDDG 2008). Unter einem SCC versteht man einen malignen Tumor der Haut, der von Keratinozyten des *Stratum spinosum* ausgeht. Die Tumore treten vorwiegend an sonnenlichtexponierten Arealen auf. Etwa 90% aller SCC sind im Gesichtsbereich lokalisiert. Histologisch zeigen sich SCC als Bereiche squamös differenzierter, atypischer Keratinozyten mit einer ausgeprägten heterogenen Zellmorphologie und Hyperchromasie. Durch invasives Wachstum wird die Basalmembran zerstört und zunächst die Dermis infiltriert, etwa 5% der SCC metastasieren (Breuninger et al. JDDG 2008).

1.5 UV-Strahlung und Karzinogenese

Aufgrund ihrer großen Kontaktfläche ist die Haut verschiedenen schädigenden Umwelteinflüssen besonders intensiv ausgesetzt. Unter den vielfältigen Arten von Strahlung spielt das Sonnenlicht eine herausragende Rolle, da wir den Strahlen der Sonne ständig ausgesetzt sind. Ultraviolette (UV)-Strahlung umfasst drei Bereiche, die physikalisch und biologisch verschiedene Wirkungen induzieren: UV-A (380-315 nm), UV-B (315-280 nm) und UV-C (280-100 nm). Die nicht-ionisierende UV-Strahlung ist in der Lage, Schädigungen an der DNA herbeizuführen (Shea und Parrish, 1993). Epidemiologische und experimentelle

Studien konnten belegen, dass UV-B-Strahlung ein Hauptrisikofaktor für die Entstehung von NMSC ist (Brash et al., 1991; de Gruijl und Forbes, 1995; Nataraj et al., 1995).

UV-Strahlung wird besonders von Proteinen, Lipiden und der DNA absorbiert. UV-B-Absorption findet primär in den Pyrimidinbasen der DNA statt und löst hier spezifische Defekte aus. In der Regel handelt es sich dabei um die Bildung von Zyklobutan-(Pyrimidin)-Dimeren (Berg et al., 1995; Rünger et al., 1995). Nach UV-B-Exposition können sich zwei auf demselben Strang liegende Pyrimidinbasen kovalent zu Doppelmolekülen verbinden (C→T und CC→TT). Betroffene DNA-Abschnitte werden ohne eine Korrektur bei der Replikation der DNA nicht mehr korrekt vervielfältigt, Mutationen können entstehen und sich anhäufen. Liegen mutierte DNA-Sequenzen in aktiv transkribierten Abschnitten, insbesondere in Proto-Onkogenen (kodieren für Proteine, die Zellproliferation und -Differenzierung kontrollieren) oder Tumorsuppressorgenen (kodieren für Proteine, die den Zellzyklus hemmen), kann eine maligne Transformation der betroffenen Zelle die Folge sein (Ananthaswamy und Pierceall, 1990). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das p53-Tumorsuppressorgen in 7% der frühen AK und in mehr als 90% der kutanen SCC mutiert ist (Ziegler et al., 1993; Nindl et al., 2007). Klinisch manifestieren sich chronische UV-Schäden in der Haut schließlich u.a. in der möglichen Entstehung kutaner Präkanzerosen, wie beispielsweise AK, mit der potentiellen Progression zu epithelialen NMSC (Darr und Fridovich, 1994).

1.6 Humane Papillomviren (HPV)

Papillomviren (PV) sind unbehüllte, doppelsträngige DNA-Viren mit einem Virionendurchmesser von etwa 55 nm. Ihr Genom liegt in einem ikosaedrischen Kapsid verpackt vor (Pfister und Fuchs, 1987). PV bilden die Familie der *Papillomaviridae* (van Regenmortel et al., 2000) und sind wirtsspezifisch. Beim Menschen sind ca. 100 vollständig sequenzierte humane PV (HPV-) Typen bekannt (de Villiers et al., 2004; Bernard, 2005). HPV sind epitheliotrop und infizieren primär basale Keratinozyten der Haut oder der Schleimhaut (Mukosa). Dort können sie eine Hyperproliferation des Epithels induzieren.

Man unterscheidet taxonomisch alpha-PV (mukosale), mu und nu-PV (warzenassoziierte, einschließlich Spezies 2 und 4 der alpha-PV sowie einige gamma-PV) und beta/gamma-PV (kutane). Diese Einordnung basiert u.a. auf Sequenzunterschieden innerhalb der PV. Mukosale HPV-Typen werden nach ihrem klinischen Erscheinungsbild, der Assoziation mit benignen oder malignen Läsionen, in:

Niedrig-Risiko (LR, Low Risk)	z.B. HPV 6, -11 und
Hoch- Risiko (HR, High Risk)	z.B. HPV 16, -18, -31, -33, -35, -45

HPV-Typen unterteilt (Munoz et al., 2003; Narechania et al., 2005; zur Hausen, 2002). Seit 1995 werden die alpha-HR mukosalen Typen HPV 16 und HPV 18 von der WHO als kausale Faktoren für die Entstehung von Zervixkarzinomen anerkannt. Das Zervixkarzinom ist die zweithäufigste Krebserkrankung bei Frauen weltweit (Parkin *et al.*, 2001). Weiterhin infizieren mehr als 40 Typen der alpha-HPV den Anogenitaltrakt und lösen benigne oder maligne Tumore wie Feigwarzen (zur Hausen, 1987; Walboomers et al., 1999; Fehrman und Laimins, 2003), Penis- und Vulvakarzinome sowie oropharyngeale (Mund/Rachen) Karzinome aus.

Warzen assoziierte HPV-Typen verursachen benigne, kutane Warzen vorwiegend an Händen (*Verrucae vulgares*, Vulgärwarzen) und Füßen (*Verruca plantares*, Dornwarzen). Die beta-HPV-Typen sind primär mit weitestgehend unauffälligen kutanen Läsionen assoziiert. Sie wurden historisch bedingt als *Epidermodysplasia verruciformis* (EV) Typen bezeichnet, da sie zunächst aus Hautläsionen von Patienten mit diesem Krankheitsbild kloniert wurden (Jablonska et al., 1972). Bei EV-Patienten, wie auch in immunsupprimierten Organtransplantierten und HIV-Patienten, wurde erstmals eine Beteiligung von beta-HPV-Typen an der Entstehung von epithelialen Präkanzerosen sowie SCC diskutiert (Harwood et al., 1999; Pfister, 2003; Palefsky, 1991; Berger et al., 1991; Waterboer et al., 2008). Bei der Progression von BCC scheinen HPV dagegen keine entscheidende Rolle zu spielen (Karagas et al., 2006).

1.7 HPV Genomorganisation und Replikationszyklus

Das Genom der HPV besteht aus einer zirkulären, doppelsträngigen DNA von etwa 8000 bp. Die prinzipielle Struktur des Genoms ist, trotz großer Sequenzunterschiede, innerhalb der verschiedenen HPV-Typen hoch konserviert. Die Genomorganisation von HPV 8 ist in Abbildung 1.3 vereinfacht dargestellt. Das HPV-Genom wird in drei funktionelle Bereiche eingeteilt,

- (1) die nicht codierende Region (*non-coding region*, NCR),
- (2) die frühe Region (*early*, E) sowie
- (3) die späte Region (*late*, L).

Die NCR ist in der Regel etwa 600 bp lang. Dieser DNA-Abschnitt enthält neben dem Ursprungspunkt der viralen DNA-Replikation und den Promotoren zahlreiche weitere Kontrollelemente, welche der Modulation der Transkription und der viralen Replikation dienen (Pfister und Fuchs, 1994; Howley, 1996). Die L-Region besteht aus zwei ORF für das große Kapsidprotein L1 und das kleine Kapsidprotein L2. Diese bilden zusammen ein ikosaedrisches Hüllkapsid, welches aus 72 einzelnen Kapsomeren aufgebaut ist (Zheng und Baker, 2006).

Die E-Region umfasst mindestens fünf ORF, die von einem DNA-Strang als polyzistronische mRNA abgelesen werden (Fehrmann und Laimins, 2003). Diese kodiert für regulatorische Proteine der viralen Transkription, Replikation und Transformation. Die als virale Onkogene eingestuften Proteine E6 und E7 spielen bei der mukosalen Karzinogenese die zentrale Rolle. Auf Funktionsmechanismen von E6 und E7 wird im Abschnitt 1.9 näher eingegangen.

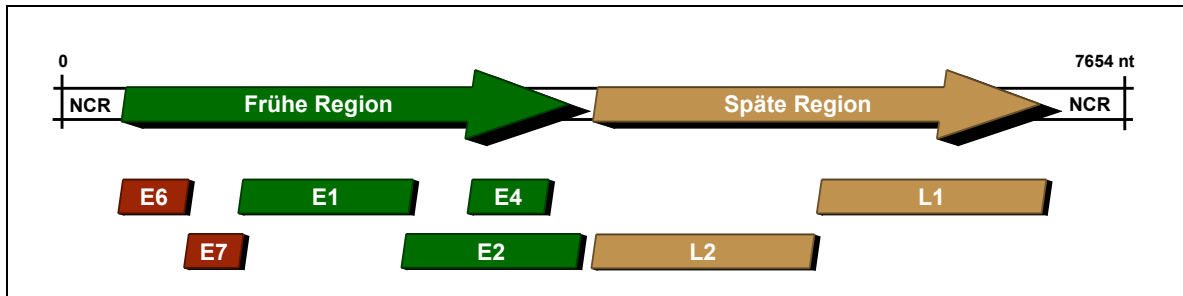


Abbildung 1.3: Genomorganisation von HPV 8 (beta-HPV).

Das zirkuläre Genom (hier linear dargestellt) besteht aus 7 offenen Leseraster (ORF) der früh (early, E), beziehungsweise spät (late, L) transkribierten Gene. Die Onkogene E6 und E7 sind rot unterlegt. Zwischen L1 und E6 liegen Regulationssequenzen im nicht-kodierenden Bereich (NCR, non coding region).

Der Replikationszyklus von HPV ist eng mit der Differenzierung der Keratinozyten in der Kutis und der Mukosa verbunden (Laimins, 1993). Über Mikroläsionen im Gewebe dringen die Viren bis zu den undifferenzierten, basalen Keratinozyten vor und werden über die Bindung an Zelloberflächenrezeptoren in die Zellen eingeschleust (Shafti-Keramat et al., 2003; Joyce et al., 1999). Die anschließende Aufnahme der Viruspartikel erfolgt vermutlich über Endozytose. Die viralen frühen Gene E1 und E2 werden zunächst nur in geringem Maße synchron mit der zellulären DNA-Synthese repliziert (Stubenrauch und Laimins, 1999). Keratinozyten des *Stratum basale* teilen sich während des Erneuerungsprozesses der Haut, was zu einer kontinuierlichen Differenzierung des Epithels führt. Nach der Zellteilung verbleibt eine infizierte Tochterzelle in der Basalschicht und bildet somit ein Reservoir für das Virus, das bis zu mehreren Jahren dort persistieren kann (Stubenrauch und Laimins, 1999). Die andere Tochterzelle wandert zu den oberen Strata des Epithels. In differenzierten Keratinozyten erfolgt die verstärkte Replikation des Virusgenoms. So sind im *Stratum spinosum* E6 und E7 Transkripte nachweisbar. Beginnend im *Stratum granulosum* ist die DNA-Replikation von der Expression der viralen Kapsidproteine L1 und L2 begleitet, was zum Zusammenbau von infektiösen Viruspartikeln führt (Doorbar, 2005). Die Freisetzung dieser infektiösen Viren erfolgt durch die Abschilferung infizierter Keratinozyten in den oberen Hautschichten.

1.8 HPV Virusproteine E6 und E7

Das E6-Onkoprotein von HPV besteht aus etwa 160 Aminosäuren und besitzt vier Cys-X-X-Cys-Motive, die sich zu zwei Zinkfingern zusammenlagern können (Grossman und Laimins, 1989). Für das transformierende Potential von E6 ist das Zusammenspiel mit verschiedenen zellulären Proteinen maßgeblich. Die wichtigste Funktion des E6-Proteins der HR-HPV ist die Interaktion mit dem Tumorsuppressorprotein p53 (Werness et al., 1990; Scheffner et al., 1990). Über die Bindung und Degradation von p53 wird dessen Transport in den Zellkern verhindert (Scheffner et al., 1990). Dies ist entscheidend im Rahmen der Transformation und Karzinogenese (Fehrman und Laimins, 2003), da p53 eine wichtige Rolle in der Zellzyklus-Kontrolle sowie der Apoptoseinduktion nach DNA-Schädigung spielt. Das E6 Protein der kutanen HPV-Typen, HPV 8 (beta-HPV) sowie HPV 1 (mu-HPV) induziert jedoch keine Bindung, respektive Degradation von p53 (Steger und Pfister, 1992; Elbel et al., 1997).

Darüber hinaus kann E6 die Degradation des pro-apoptotischen Bak-Proteins induzieren (Thomas und Banks, 1998). Bak ist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und wird auch in Keratinozyten exprimiert (Tomkova et al., 1997). In epithelialen Zellen wurde gezeigt, dass E6 der HR-HPV nach UV-B Exposition an Bak bindet und dessen Degradation verursacht (Thomas und Banks, 1998). Der Eintritt der Keratinozyten in p53 unabhängige Apoptosemechanismen wird so verhindert.

Einen weiteren Beitrag zur Transformation von Keratinozyten kann E6 der HR-HPV durch die Aktivierung der zellulären Telomerase leisten (Gewin und Galloway, 2001). Primäre, somatische Zellen durchlaufen eine begrenzte Anzahl von Zellteilungen, bevor sie ihr Wachstum einstellen. Chromosomenenden (Telomere) primärer Zellen verlieren bei jeder Zellteilung 50 bis 200 bp. Bei Erreichen einer kritischen Telomerlänge wird über die zellzykluskontrollierenden Tumorsuppressorproteine p53 und pRb (Retinoblastomprotein) das „Mortalitätsstadium 1“ (M1; Abbildung 1.4) ausgelöst. Primäre Zellen stellen ihr Wachstum ein, dieser Vorgang wird als Seneszenz bezeichnet. HR-E6 kann jedoch den Promotor der humanen Telomerase Reverse-Transkriptase (hTERT) aktivieren, die für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodiert (Veldman et al., 2001). Dadurch können die Zellen das folgende „Mortalitätsstadium 2“ (M2), auch Krise genannt, durch Reaktivierung des Enzyms Telomerase überwinden und in Kombination mit weiteren Defekten unbegrenzt teilungsfähig oder immortal werden (Shay et al., 2001). E6 der HR-HPV-Typen trägt *in vitro* zur Immortalisierung mukosaler Keratinozyten bei, kann diesen Prozess jedoch nicht eigenständig induzieren (Hawley-Nelson et al., 1989; Hudson et al., 1990). Im Gegensatz dazu führt eine Infektion mit LR-HPV-Typen nicht zu einer Immortalisierung (Thomas et al., 2001).

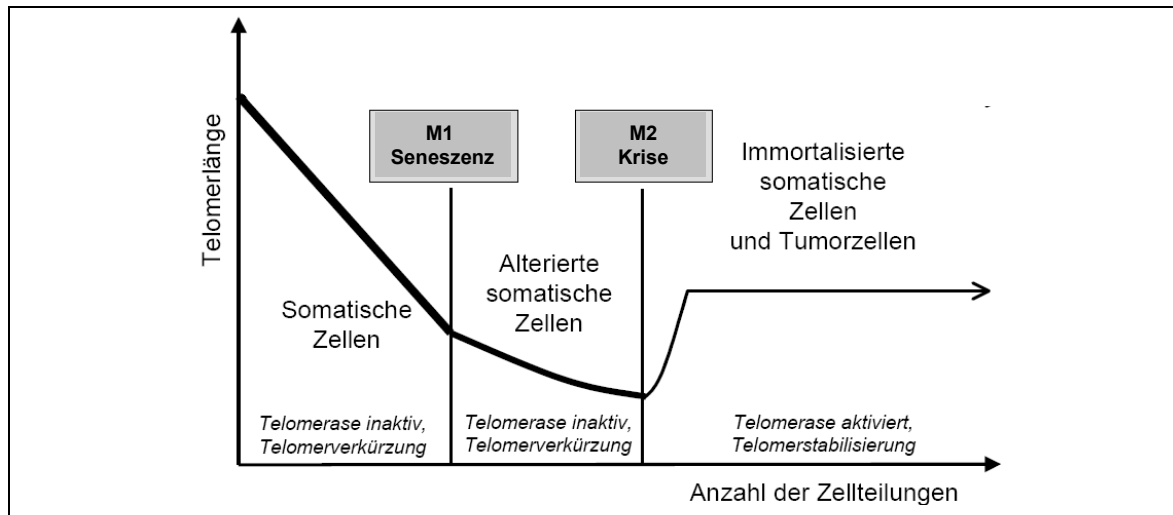


Abbildung 1.4: Telomer-Hypothese der Zellalterung und Immortalisierung (modifiziert nach Rohde et al. 1998).

In somatischen Zellen verkürzen sich die Telomere (y-Achse) mit der Anzahl der Zellteilungen (x-Achse). Telomerase ist in den meisten primären Zellen inaktiv, was in einer progressiven Telomerverkürzung resultiert. Bei einer individuell kritischen Telomerlänge kommt es zum irreversiblen Zellzyklusarrest (M1; Seneszenz), die Zellen sterben ab. Transformationsereignisse (wie die Expression von Onkogenen) ermöglichen Seneszenz und zelluläre Krise (M2) zu umgehen. Telomerase wird aktiviert und einzelne Zellen können immortal werden. M, Mortalitätsstadium.

Der HPV E7 ORF kodiert für ein Zinkfinger-Protein, welches aus ungefähr 100 Aminosäuren besteht. Das E7 Protein von HR-HPV ist hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, in geringer Mengen allerdings auch im Zytoplasma (Sato et al., 1989).

Eine wichtige Funktion von E7 der HR-HPV ist die Interaktion mit pRb (Abbildung 1.5). Dessen Proteolyse setzt den Transkriptionsfaktor E2F frei, welcher in ruhenden Zellen mit hypophosphoryliertem pRb assoziiert ist (Münger et al., 1989; Dyson et al., 1989). E2F aktiviert daraufhin eine Reihe von Genen, die für Zellzyklus-regulierende Proteine kodieren. Dadurch erfolgt der Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus. Die Folge ist eine unregulierte Zellteilung, die eine Akkumulation somatischer Mutationen nach sich zieht, da DNA-Schäden in dieser Phase des Zellzyklus von DNA-Reparatursystemen nicht ausreichend repariert werden können (Dyson et al., 1989).

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß die viralen Onkogene E6 und E7 mit einer Vielzahl zellulärer Proteine interagieren, die Funktionen innerhalb des Zellzykluses, der Apoptose und der Proliferation der Zelle ausüben. Die genauen Funktionsmechanismen von E6 und E7 der kutanen HPV-Typen sind allerdings noch weitgehend unbekannt.

1.9 HPV und NMSC

UV-Strahlung ist, wie schon erwähnt, der Hauptrisikofaktor für die Entstehung von NMSC. Ferner gibt es zunehmend mehr Anhaltspunkte, die für einen Einfluss kutaner HPV-Typen an der Hauttumorgenese sprechen. Bei Patienten mit der seltenen, familiär vererbten Krankheit EV besteht ein ursächlicher Zusammenhang zwischen HPV und Hautkrebs. EV ist ein rezessiver Immundefekt, der sich im Kindesalter mit makulösen oder flach erhabenen warzenähnlichen Hautläsionen äußert. Im späteren Verlauf können daraus, bei 30% bis 60% der Patienten, Präkanzerosen sowie SCC entstehen. Diese Läsionen entwickeln sich an sonnenlichtexponierten Arealen und sind bis zu 90 % mit HPV 5 oder 8, seltener mit HPV 12, 14, 15, HPV 20-25 und HPV 36-38 assoziiert (Elbel et al., 1997; Pfister, 2003; Steger und Pfister, 1992). Diese Erkenntnisse waren das erste Indiz für einen Zusammenhang zwischen kutanen HPV-Infektionen und der Entwicklung von SCC. Weitere Anhaltspunkte wurden bei organtransplantierten immunsupprimierten Patienten gefunden (Boyle et al., 1984; Euvrard et al., 2003). Nierentransplantierte sind beispielsweise stark anfällig für die Entwicklung von Warzen und weiteren kutanen malignen Läsionen, bevorzugt an dem Sonnenlicht ausgesetzten Körperarealen (Bavinck et al., 1993; Noel et al., 1994). Sie weisen eine etwa 200fach erhöhte Inzidenz für SCC auf (Stockfleth et al., 2001). Beta- sowie gamma-HPV-Typen wurden in zahlreichen epidemiologischen Studien in bis zu 90% der SCC von Organtransplantierten gefunden (Berkhout et al., 2000; Harwood et al., 2000; Meyer et al., 2003; Shamanin et al., 1996). Weiterhin wurde E6- oder E7-Expression in diesen Läsionen nachgewiesen (Dang et al., 2006b; Purdie et al., 2005). In den letzten Jahren konnte außerdem in zahlreichen, unabhängigen Studien gezeigt werden, dass beta- sowie gamma-HPV-Typen ebenfalls in normaler Haut, Haarfollikeln sowie in kutanen SCC von nicht EV-Patienten nachweisbar sind (Boxman et al., 1997; Boxman et al., 1999; Köhler et al., 2007; Harwood et al., 2004; Nindl et al., 2006). In Aktinischen Keratosen von Immunkompetenten findet sich zudem eine hohe Prävalenz (85%) von beta-HPV DNA (Pfister et al., 2003).

Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass eine Kombination aller hier aufgeführten ätiologischen Risikofaktoren, wie UV-Strahlung, Immunsuppression sowie HPV-Infektionen entscheidend für die Hauttumorgenese sind. Kutane HPV-Typen könnten demnach, vermutlich als Ko-Faktoren, Präkanzerosen sowie kutane SCC in einem frühen Stadium der Karzinogenese induzieren (Akgul et al., 2006).

1.10 Ziel der vorliegenden Arbeit

Bislang ist es weitgehend unklar, wie kutane HPV-Typen zur Induktion sowie Progression von NMSC beitragen. Ziel dieser Arbeit ist es, verschiedene, mit benignen oder malignen Läsionen assoziierte, kutane HPV-Typen hinsichtlich ihres viralen onkogenen Potentials zu charakterisieren. Als Zellsystem dienen die natürlichen Wirtszellen kutaner HPV-Typen, humane primäre Keratinozyten (HPK) der adulten Haut. Diese werden unter Verwendung eines retroviralen Vektorsystems mit den E6- oder E7-ORF folgender kutaner HPV-Typen infiziert: HPV 1 (mu-PV), HPV 4 (gamma-PV), HPV 5, HPV 8, HPV 20, HPV 38 und HPV RTRX7 (beta-PV). Mittels verschiedener Untersuchungen der infizierten Zelllinien, die einschichtig wachsen (Monolayer), sowie unter Verwendung eines differenzierten organotypischen Hautmodells wird konkret folgenden Fragestellungen nachgegangen (Abbildung 1.6):

Monolayer:

- Verändert die Expression von E6 oder E7 das Proliferationsverhalten?
- Führt die Expression von E6 oder E7 zu einer Immortalisierung?
- Wird durch die Expression von E6 oder E7 ein invasiver Phänotyp induziert?
- Welchen Einfluss hat UV-B Strahlung auf das pro-apoptotische Bak-Protein in Kombination mit der Expression von E6?

Organotypisches Hautmodell:

- Welchen Einfluss hat die Expression von E6 oder E7 in differenzierten HPK in Bezug auf Proliferation, Differenzierung, Invasion und Zellzyklus?

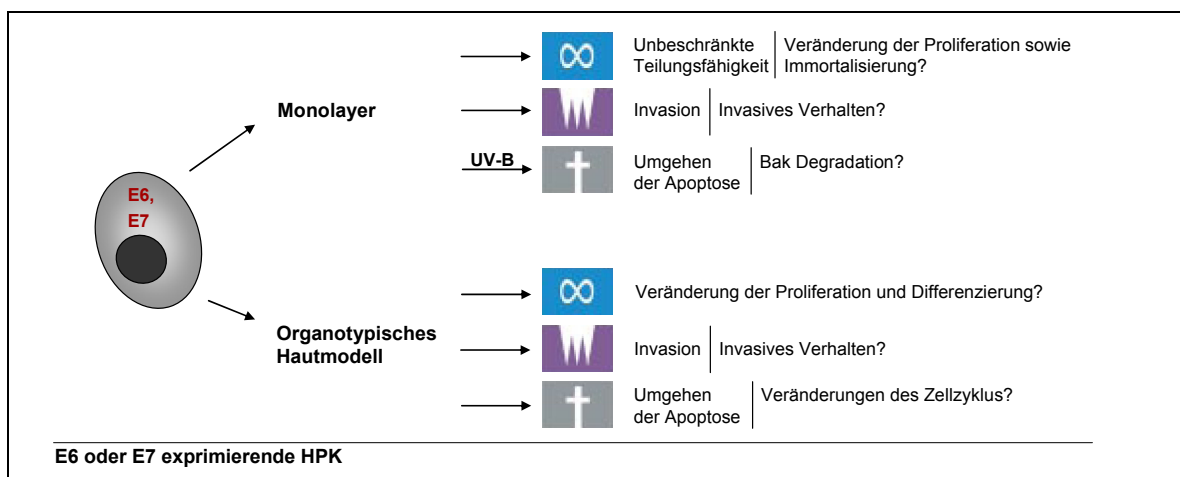


Abbildung 1.6: Darstellung der Fragestellungen der vorliegenden Arbeit unter Anlehnung an das mehrstufige Karzinogenesemodell nach Hanahan und Weinberg (2000).

Mit kutanen E6 oder E7 infizierte humane primäre Keratinozyten (HPK) werden als Monolayer und in organotypischen Hautmodellen beispielsweise auf invasives Verhalten untersucht

2 Material & Methoden

2.1 Material

Die experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité, Universitätsmedizin Berlin [01/2005-10/2007], zum Teil am *Institute of Cell and Molecular Science of Barts and the London School of Medicine and Dentistry*, London, U.K. [10/2005-12/2005] und in der ATV (Angewandte Tumorstudiologie), DKFZ, Heidelberg [10/2007-05/2008] durchgeführt. Folgende Gewebeproben, Materialien und Versuchsmethoden kamen dabei zum Einsatz:

2.1.1 Patientenproben

2.1.1.1 Spenderhaut für die Isolation humaner primärer Epithelzellen

Humane Spenderhaut aus routinemäßig durchgeführten Mammarreduktionsoperationen diente zur Isolation von HPK und HPF.

2.1.1.2 Spenderhaut für organotypische Hautkulturen

Humane in Glycerol konservierte Spenderhaut, bestehend aus Dermis und Epidermis (Euro Skin Bank, Beverwijk, Niederlande) wurde zur Konstruktion organotypischer Hautkulturen („raft culture“) verwendet.

2.1.2 Eukaryonte Zelllinien und Kulturmedien

CaSki (DKFZ, Heidelberg)

Humane epitheliale Zelllinie aus einem zervikalen SCC, aneuploid, HPV 16 positiv, etwa 500 Kopien pro Zelle, tumorigen bei s.c. Injektion in *nu/nu* Mäuse, adhärent wachsend (Baker et al., 1987).

HeLa (DKFZ, Heidelberg)

Humane epitheliale Zelllinie aus einem zervikalen Adenokarzinom, aneuploid, HPV 18 positiv, ca. 50 Kopien pro Zelle, tumorigen bei s.c. Injektion in *nu/nu* Mäuse, adhärent wachsend (Boshart et al., 1984; Schwarz et al., 1985).

iHK HPV 16 E7 (DKFZ, Heidelberg)

Humane epitheliale Zelllinie aus mit HPV 16 E7 transfizierten Vorhaut-Keratinocyten, adhärent wachsend (Aguilar-Lemarroy et al., 2002).

NIH/3T3 (ATCC; American Type Culture Collection)

Murine epitheliale Zelllinie aus embryonalen NIH Swiss Mäusen, adhärent wachsend, „feeder“-Zellen für die Kultivierung primärer humaner Keratinozyten (Rheinwald und Green, 1975).

SCL-II (Dr. Ralf Kriehuber, Universität Rostock)

Humane epitheliale Zelllinie aus einem differenzierten kutanen SCC, p53 defizient, tumorigen bei s.c. Injektion in nu/nu Mäuse, adhärent wachsend (Tilgen et al., 1983).

pT67 (Clontech, Mountain View, USA)

Von NIH3T3 abgeleitete Fibroblastenzelllinie zur Herstellung infektiöser, nicht replikationsfähigen Retroviren. PT67-Zellen enthalten die gag-, pol- und env- Gene des Moloney-Murine-Leukemia-Virus (MoMuLV) stabil in ihr Genom integriert. Das env-Gen ist vom Typ 10A1 abgeleitet und kodiert für zwei Oberflächenproteine, die an die amphotrophischen zellulären Rezeptoren RAM1 und GALV anbinden können (Miller und Chen, 1996). Die Transfektion mit einem Expressionsvektor, der das retrovirale Verpackungssignal ψ^+ , sowie das zu untersuchende Fremdgen und einen Selektionsmarker enthält, erlaubt die Produktion von infektiösen, nichtreplikationsfähigen Viren (Retro-XTM System).

2.1.3 Bakterienstämme und Nährmedien**2.1.3.1 Bakterienstämme**

DH5 α TM-T1R Competent Cells (Invitrogen, Karlsruhe):

F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk-, mk+)

phoA supE44 λ - thi-1 gyrA96 relA1 tonA;

chemisch kompetent, geeignet zur Transfektion mittels themischen Schocks

2.1.3.2 Nährmedien

LB (Luria et al., 1960), 1L, pH7,0

LB-Agar

SOC (Fertigmedium)

Trypton 10 g, Hefeextrakt 5 g, NaCl 10 g

15 g Agar-Agar/L LB Medium

Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4 Plasmide und Oligonukleotide

2.1.4.1 Plasmide für Klonierungen

Tabelle 2.1: Papillomvirus-Plasmide

Plasmid	Größe (nt)	Vektor	Schnittstelle	Bezugsquelle	Referenz
HPV 1	7816	pBR322	BamHI	G. Orth, Institut Pasteur, Paris,F	(Favre et al., 1977)
HPV 4	7353	pBR322	BamHI	G. Orth, Institut Pasteur, Paris,F	(Orth et al., 1978)
HPV 5	7746	pBR322	BamHI	G. Orth, Institut Pasteur, Paris,F	(Ostrow et al., 1982)
HPV 20	7757	pBR322	AvaI	G. Orth, Institut Pasteur, Paris,F	(Kremsdorf et al., 1984)
HPV 38	7400	pUC19	EcoRI	E.-M. de Villiers, DKFZ, Heidelberg	(Scheurlen et al., 1986)

nt, Nukleotide

Tabelle 2.2: Retrovirale Plasmide

Plasmid	Größe (nt)	Eigenschaften	Referenz
pLXSN	5874	5' MoMuSV LTR: 1-589 Ψ ⁺ Verpackungssignal: 659-1468 MCS: 1470-1491 Neo ^R : 1892-2686 Amp ^R : 5495-4635	(Miller und Chen, 1996)

nt, Nukleotide

Folgende Plasmide wurden von Dr. Baki Akgül (Universität Köln) zur Verfügung gestellt:

Tabelle 2.3: Zur Transfektion in pT67 verwendete pLXSN-Plasmide

Plasmid	Referenz
pLXSN HPV 1 E7	(Smola-Hess et al., 2005)
pLXSN HPV 8 E6	(Akgul et al., 2005)
pLXSN HPV 8 E7	(Akgul et al., 2005)
pLXSN HPV 16 E6	(Akgul et al., 2005)
pLXSN HPV 16 E7	(Halbert et al., 1992)
pLXSN RTRX7 E7	(persönliche Mitteilung, Dr. Baki Akgül, Universität Köln)

2.1.4.2 Synthetische Oligonukleotide (primer)

Die spezifischen, HPLC gereinigten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) hergestellt. Für die Vervielfältigung von RNA in RT-Reaktionen wurden Oligo(dT)-Primer verwendet.

Oligo (dT)12-18 Primer (0,5 mg/ml)

Invitrogen, Karlsruhe

Im Folgenden sind verwendete Oligonukleotide für Klonierungen kutaner HPV E6 oder E7 ORF sowie für Expressionsuntersuchungen aufgeführt.

Tabelle 2.4: Synthetische Oligonukleotide für Klonierungen

Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind fett markiert, zusätzliche Nukleotide unterstrichen.

Bezeichnung	Oligonukleotid Sequenz 5'-3'	Position
HPV 1 E6 EcoRI-F	<u>acacccttgaattcc</u> acaggaccagatggcga	93-110
HPV 1 E6 BamHI-R	<u>cgggatccc</u> ggtccttagtgctggatttc	559-538
HPV 4 E6 EcoRI-F	<u>tggaattc</u> cagatggcagatggcagac	99-117
HPV 4 E6 BamHI-R	<u>cgggatccc</u> gctgctctctcattgttc	535-515
HPV 4 E7 EcoRI-F	<u>ggaattc</u> caacaatgagaggagcagcgc	517-536
HPV 4 E7 BamHI-R	<u>cgggatccc</u> gcattctgcttcatggacaata	884-863
HPV 5 E6 HpaI-F	<u>tgccgcgttaac</u> gattgggttcttctgtaatcagg	175-197
HPV 5 E6 BamHI-R	<u>agcttggatccc</u> gaatatcttgacggtgacctc	695-675
HPV 5 E7 EcoRI-F	<u>ggaattc</u> cggaaatctgtaggcagtgaagca	632-654
HPV 5 E7 XhoI-R	<u>ccgctcgagc</u> ggcaccaatcaccaaacccttc	1016-997
HPV 20 E6 EcoRI-F	<u>tggaattc</u> cagtgcaggcacatggctaca	189-208
HPV 20 E6 BamHI-R	<u>cgggatccc</u> gcaatgtgacctctttaccaatca	721-698
HPV 20 E7 EcoRI-F	<u>ggaattc</u> cggaaatctgtaggctgtgtaagc	665-686
HPV 20 E7 XhoI-R	<u>ccgctcgagc</u> ggcaatcatccaacccgtctt	1038-1020
HPV 38 E6 EcoRI-F	<u>ggaattc</u> caaggatatattaagggcctgt	160-182
HPV 38 E6 BamHI-R	<u>cgggatccc</u> tcacgaagagtagctgtttcc	650-629
HPV 38 E7 EcoRI-F	<u>gaagcttgaattc</u> ggcattgcaaagcaatagaa	603-622
HPV 38 E7 BamHI-R	<u>agcttggatccc</u> gcagccttcttaggatcagtacc	948-926

F, vorwärts; R, rückwärts

Tabelle 2.5: Synthetische Oligonukleotide für Expressionsuntersuchungen (RT-PCR)

Bezeichnung	Oligonukleotid Sequenz 5'-3'	Position	Fragmentgröße [bp]
HPV 1 E6 Expr-F	atgctgtcaagggtgtgcta	274-293	195
HPV 1 E6 Expr-R	tgactctttctccgtttga	468-449	
HPV 1 E7 Expr-F	tatgctgtcgttgcttcctg	664-683	115
HPV 1 E7 Expr-R	cgatgttcaaagatcgaga	778-759	
HVP 4 E6 Expr-F	cttctgcagacgattcgaca	134-153	237
HVP 4 E6 Expr-R	tgagcaatttcctccaaatg	370-351	
HVP 4 E7 Expr-F	gctgagtgaggaggtcttgc	592-621	159
HVP 4 E7 Expr-R	tgttccaagggtccgtagtcc	750-731	
HPV 5 E6 Expr-F	agccgaacaccaacagaaac	211-230	211
HPV 5 E6 Expr-R	acagcacgcaaacacacaat	421-402	
HPV 5 E7 Expr-F	ggttgcaggaaactgtgaggt	831-850	94
HPV 5 E7 Expr-R	gcagatctccggtcagtagc	924-905	
HPV 8 E6 Expr-F	cattgcaggactgttcagtaccg	287-309	258
HPV 8 E6 Expr-R	acaagcagttttgacacctaacgtcta	518-544	
HPV 8 E7 Expr-F	tgctgtcagggtcaagctacg	830-849	106
HPV 8 E7 Expr-R	ggcactcaggacacagaagc	935-916	
HPV 16 E6 Expr-F	ttgcttttcgggatttatgc	237-256	204
HPV 16 E6 Expr-R	caggacacagtggcttttga	440-421	
HPV 16 E7 Expr-F	gctcagaggaggaggatgaa	653-672	109
HPV 16 E7 Expr-R	aaccgaagcgtagagtcaca	761-742	
HPV 20 E6 Expr-F	catttggttttgcattgctg	434-453	234
HPV 20 E6 Expr-R	tcctttccaagagcctctca	667-648	
HPV 20 E7 Expr-F	cagcctgagggttaaccagt	751-770	71
HPV 20 E7 Expr-R	tcctctctctctgtgctc	821-802	
HPV 38 E6 Expr-F	tctgcaacagtttctctcag	285-304	173
HPV 38 E6 Expr-R	aatttcacggccaaagacag	457-438	
HPV 38 E7 Expr-F	agaggaggagccagcataca	741-760	151
HPV 38 E7 Expr-R	ggtgggacacagaagcctta	891-872	
RTRX7 E7 Expr-F	agtgaggtgcagcctgaagt	712-731	82
RTRX7 E7 Expr-R	actcctcctccgtttcctgt	793-774	
RPS9 – F	atccgccagcgccata	423-438	86
RPS9 – R	tcgatgtgcttctgggaatcc	508-488	

F, vorwärts; R, rückwärts

Im Folgenden sind verwendete Oligonukleotide für Mykoplasmentest und die Überprüfung der Expression der humanen *Telomerase Reverse Transkriptase* (hTERT) aufgeführt.

Tabelle 2.6: Synthetische Oligonukleotide für Mykoplasmen und hTERT-Expression

Bezeichnung	Oligonukleotid Sequenz 5'-3'
Myk - F	gggagcaaacaggattagataccct
Myk - R	tgcaccatctgtcactctgttaacctc
hTERT - F	cggagagtgctctggagcaa
hTERT - R	ggatgaagcggagtctgga

F, vorwärts; R, rückwärts

2.1.5 Antikörper und Enzyme

2.1.5.1 Primärantikörper für Immunhistochemie

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper für immunhistochemische Färbungen aufgeführt. Wenn nicht gesondert vermerkt, erfolgte die Verdünnung der Antikörper in BSA Blocklösung mit 10% Ziegenserum und die Inkubation für 1 h bei RT.

Tabelle 2.7: Primärantikörper für Immunhistochemie bzw. Immuncytochemie

Antikörper	Tier	Klon	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-BrdU (5-Bromodeoxyuridin)	Maus IgG ₁	monoklonal MoBu1	1:50	Acris, Hiddenhausen SM3005P
Cyclin E	Maus IgG ₁	monoklonal HE12	1:30	Abcam, Cambridge, U.K. ab3927
Cytokeratin 10	Maus IgG ₁	monoklonal VIK-10	1:200	Acris, Hiddenhausen SM3042P
Cytokeratin 14	Maus IgG ₃	monoklonal LL002	1:500	Acris, Hiddenhausen SM1359P
HPV16 E7	Maus IgG ₁	monoklonal 8C9	1:2	zymed, Wien, A 28-0006
Involucrin	Maus IgG ₁	monoklonal SY5	1:500	Acris, Hiddenhausen DM3111

Ki67	Maus IgG ₁	monoklonal MIB-1	1:50	DAKO, Hamburg M7240
p16 ^{INK4a}	Maus IgG _{2a}	monoklonal E6H4	1:200	MTM, Heidelberg
p53	Maus IgG _{2b}	monoklonal Do-7	1:200	DAKO, Hamburg M7001
Tenascin C	Maus IgG ₁	monoklonal DB7	1:4.000	BioHit Oy, Helsinki, Finland

2.1.5.2 Sekundärantikörper für Immunhistochemie

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper für Fluoreszenz-Immunhistochemie-Experimente aufgeführt. Die Antikörper wurden in BSA Blocklösung verdünnt und 1 h, im Dunkeln, bei RT verwendet.

Tabelle 2.8: Sekundärantikörper für Immunhistochemie

Antikörper	Tier	IgG-Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
Alexa Fluor 594	Ziege anti Maus	IgG _{2a}	1:4.000	Invitrogen, Karlsruhe A21145
Alexa Fluor 488	Ziege anti Maus	IgG ₁	1:4.000	Invitrogen, Karlsruhe A21121

2.1.5.3 Primärantikörper für Western Blot Analyse

Im Folgenden sind primäre Antikörper aufgeführt, die für Western Blot Analysen verwendet wurden. Wenn nicht im Besonderen vermerkt, wurden die Antikörper in Blocklösung verdünnt und 2 h bei RT verwendet.

Tabelle 2.9: Primärantikörper für Western Blot Analyse

Antikörper	Tier	Klon	Verdünnung	Bezugsquelle
Aktin	Maus IgG ₁	monoklonal C4	1:40.000	Mpbio, Solon, USA 69100
p53	Maus IgG _{2a}	monoklonal Do1	1:4.000	Santa Cruz, Heidelberg sc-126
Bak	Kaninchen IgG	monoklonal Y164	1:5.000 in BSA Blocklösung	Abcam, Cambridge, U.K. ab32371
HPV 16 E6	Maus IgG _{2a}	monoklonal 2E-3F8	1:500	Euromedex Souffelweyersheim, F 2E-3F8
HPV 16 E7	Maus IgG _{2a}	monoklonal nm2	1:2.000	M.Müller, DKFZ

2.1.5.4 Sekundärantikörper für Western Blot Analysen

Alle verwendeten Zweitantikörper für Western Blot Analysen sind Peroxidase (HRP) gekoppelt und affinitätsgereinigt. Die Antikörper wurden in Blocklösung verdünnt und 1 h bei RT inkubiert.

Tabelle 2.10: Sekundärantikörper für Western Blot Analysen

Antikörper	IgG-Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
Ziege anti Maus HRP gekoppelt	IgG	1:20.000 bis 1:40.000	Dianova, Hamburg 115-035-062
Ziege anti Maus HRP gekoppelt	IgG _{2a}	1:5.000	Santa Cruz, Heidelberg sc-2970
Ziege anti Kaninchen HRP gekoppelt	IgG	1:20.000 bis 1:40.000	Dianova, Hamburg 111-035-144

Enzyme

Antarktische Phosphatase
DNaseI (1U/μl)
Restriktionsenzyme
T4 DNA Ligase
Taq-Polymerase (5U/μl)

New England Biolabs, Frankfurt
Invitrogen, Karlsruhe
New England Biolabs, Frankfurt
Roche Diagnostics, Mannheim
Invitrogen, Karlsruhe

2.1.6 DNA- und Protein-Größenstandards

Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten bzw. isolierten Proteinen wurden die im Folgenden aufgeführten Größenstandards verwendet.

2.1.6.1 DNA-Größenstandards

<i>Low Molecular Weight DNA ladder</i>	New England Biolabs, Frankfurt
100 bp DNA Leiter	Roth, Karlsruhe
1 kb DNA Leiter	Roth, Karlsruhe

2.1.6.2 Proteingrößenstandards

<i>Page Ruler prestained</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
------------------------------	-------------------------

2.1.7 Reagenzien

Acrylamid/Bis-Acrylamid (29:1), 30 % Lösung	Serva, Heidelberg
Agarose für die Elektrophorese	Roth, Karlsruhe
Ampizillin	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Aqua ad iniectabilia</i>	Braun, Melsungen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Biomol, Hamburg
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
50x Complete Protease Inhibitor	Roche Diagnostics, Mannheim
ECL-Reagenz	Amersham-Pharmacia, Freiburg
SuperSignal West Ultra Dura / Femto	Pierce, Woburn, USA
Ethidiumbromid-Lösung, 1%	Fluka, Deisenhofen
<i>Fluorescent mounting medium</i>	Dako, Hamburg
Glycerin p.a., 87%	Merck, Darmstadt
Hämalaun (sauer)	Roth, Karlsruhe
Kaisers Glyceringelantine	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
MG132	Biomol, Hamburg
Nonidet-P40, 10%	Roche Diagnostics, Mannheim
PMSF	Applichem, Darmstadt
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Ziegenserum	Dianova, Hamburg

Reagenzien für die Zellkultur

Adenin	Sigma, Deisenhofen
<i>Antibiotic-Antimycotic Solution</i> (100x)	PAA, Pasching, A
Calcein-AM	Invitrogen, Karlsruhe
Choleratoxin	Sigma, Deisenhofen
Collagenase D	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Cryo-SFM Einfriermedium</i>	Promocell, Heidelberg
Dispase	Gibco, Eggenstein
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM/F12	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Merck, Darmstadt
EpiLife Medium (M-EPI-500-CA)	Invitrogen, Karlsruhe
FCS	Biochrom, Berlin
<i>FuGene6</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
Genitizin (G418)	PAA, Pasching, A
<i>Human Keratinocyte Growth Supplement</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Hydrocortisone	Sigma, Deisenhofen
Insulin	Sigma, Deisenhofen
Lyothyronine	Sigma, Deisenhofen
Mytomycin C	Sigma, Deisenhofen
PBS mit Ca	PAA, Pasching, A
PBS ohne Ca	PAA, Pasching, A
Penizillin 10.000 U/ml/Streptomycin 10.000 U/ml	Gibco, Eggenstein
Polybrene (Hexadimethrinbromid)	Sigma, Deisenhofen
Transferrin	Sigma, Deisenhofen
Triiodothyronin	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco, Eggenstein
Trypsin-Inhibitor	Sigma, Deisenhofen

2.1.8 Puffer und Lösungen

Alle Lösungen wurden, falls nicht anders angegeben, in Wasser (ddH_2O) angesetzt und autoklaviert.

BSA-Blocklösung	5% BSA in TBS, steril filtrieren
Blocklösung für <i>Western Blot</i>	5% Magermilchpulver in TBST
DEPC- Wasser	0,1% Diethylpyrocarbonat autoklavieren

DNA-Ladepuffer 6x	1x TE (pH 7,5) 30% Glycerin 0,25% Bromphenolblau Lagerung bei 4°C
DTT	0,1 M Stocklösung immer frisch ansetzen
EDTA	0,5 M EDTA, pH 8,0
Lysepuffer für Gesamtzellextrakte	20 mM Tris-HCl, pH 7,4 1% NP40 150 mM NaCl 5 mM EDTA 25 mM NaF 1% SDS
SDS-Sammelgel	125 mM Tris-HCl, pH 6,8 5% Acrylamid/Bisacrylamid 0,1% SDS 0,04% APS 0,075% TEMED
SDS-Trenngel	35 mM Tris-HCl, pH 8,8 7,5%-12% Acrylamid 0,1% SDS 0,04% APS 0,075% TEMED
SDS-Probenpuffer (5x)	312,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 25% β -Mercaptoethanol 10% Glycerol 10% SDS 0,01% Bromphenolblau
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresepuffer (SDS-PAGE Puffer, 5x)	125 mM Tris 960 mM Glycin 0,5% SDS
Ponceau-Rot-Lösung	0,2% Ponceau S 3% Essigsäure
Proteaseinhibitoren (Zugabe in Lysepuffer)	0,05 mM PMSF 1x Complete (50x) 0,01 mM MG-132
TAE-Laufpuffer 50x	2 M Tris-Base 0,25 M Natriumacetat 0,05 M EDTA pH 8,0 mit 1 M Essigsäure auf pH 7,8 einstellen

TE-Puffer 100x	1 M Tris-Base 0,1 M EDTA pH 8,0 mit HCl pH 7,75 einstellen, autoklavieren
TBS 10x	100 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 M Natriumchlorid
TBST 1x	10 mM Tris-HCl pH 7,5 100 mM Natriumchlorid 0,001% Tween 20
<i>Western Blot-Puffer (semidry)</i>	25 mM Tris-Base 190 mM Glycin 0,038% SDS 20% Methanol

Medien und Lösungen für die Zellkultur

DMEM	500 ml Fertigmedium Zugabe von: 10% FCS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Einfriermedium	jeweiliges Kulturmedium mit 10% DMSO
Zelllinien	sterilfiltrieren durch 0,22 µm Filter, bei -20°C lagern
Keratinozytenmedium	EpiLife Medium (Basalmedium mit 60µM CaCl ₂) versetzt mit <i>Human Keratinocyte Growth Supplement</i> Enkonzentration: boviner Hypophysenextrakt 0,2% v/v bovines Insulin 5 µg/ml Hydrocortisone 0,18 µg/ml bovines Transferrin 5 µg/ml huEGF 0,2 ng/ml

RM+ Medium	DMEM, 60% versetzt mit DMEM / Hams F12 (1:1), 30% FCS, 10% Enkonzentration: Penicillin-Streptomycin 0,01% Hydrokortison 0,4 mg/ml Choleratoxin 10^{-10} M Transferrin 5 mg/ml Triiodothyronin 2×10^{-11} M Adenin $1,8 \times 10^{-4}$ M Insulin 5 mg/ml EGF 10 ng/ml
Trypanblau-Lösung	0,25 % Trypanblau in PBS lösen sterilfiltrieren
Trypsin/EDTA	Fertiglösung von Invitrogen, Karlsruhe 0,5 g/l Trypsin 0,2 g/l Na ₂ EDTA x 4 H ₂ O

2.1.9 Verbrauchsmaterial

Sterile Einwegmaterialien wie Pipetten, Pipettenspitzen, Eppendorfgefäße (0,2; 0,5; 1,5 und 2 ml), Kryoröhrchen (2 ml; 4 ml), Schraubdeckel-Röhrchen (1,5; 15 und 50 ml), Zellkulturflaschen (T25, T75, T175) und –schalen (60 mm, 100 mm) wurden von Falcon/Becton Dickinson, Heidelberg; Sarstedt, Nümbrecht; und Eppendorf, Hamburg bezogen. Spezielle Verbrauchsmaterialien sind nachfolgend aufgeführt:

BD Falcon HTS Fluoroblok™ Inserts mit 8 µm Porengröße Einmalspritzen (steril) Fujifilm Super RX (Röntgenfilm) Polystyrolröhrchen PVDF-Transfer Membran Sterilfilter Minisart Plus Whatmann 3 MM Papiere	Becton-Dickinson, Heidelberg Becton-Dickinson, Heidelberg Fuji, Bedford, UK Greiner, Nürtingen GE Healthcare, München Sartorius, Göttingen Schleicher und Schüll, Dassel
--	--

2.1.10 Kommerzielle Kits

Folgende kommerziellen Kits wurden in dieser Arbeit verwendet:

100 mM dNTP Set PCR Grade	Herstellung von dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
BCA™ Protein Assay Kit	Bestimmung der Proteinkonzentration	Pierce, USA Woburn,
Deoxyribonuclease I Amplification Grade	DNase-Verdau von RNA	Invitrogen, Karlsruhe
LSAB2-System-HRP-Kit inkl. AEC-Chromogen- Substrat	Immunohistochemie	Dako, Hamburg
Plasmid-Maxi-Kit aus Bakterien	Präparation großer DNA Mengen	Qiagen, Hilden
QIAquick Gelextraction Kit	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	Qiagen, Hilden
Retro X-System	Herstellung von Retroviren	Clontech, Mountain View, USA
RNeasy Plus Mini-Kit	Präparation von Gesamt-RNA aus humanen Zellen	Qiagen, Hilden
SuperScript™ First-Strand Synthesis System	Reverse Transkription	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.11 Geräte

Neben Laborgeräten wie Tischzentrifuge, Thermomixer, Vortexer, pH-Meter, Heiz- und Magnetrührer wurden nachfolgende Geräte verwendet:

Inkubationsschüttler Innova 4200	Thermo Scientific, Waltham, USA
Begasungsbrutschrank	Heraeus, Hanau
Blotkammer (<i>semidry</i>) TE77	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Casy 1 <i>cellcounter</i>	Innovatis, Bielefeld
Geldokumentationssystem	Syngene Cambridge, UK
Hybridisierungsöfen, Hybrid Mini	Bachhofer, Reutlingen
Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop, Axiovert 10	Zeiss, Jena
Mikroskop, Axioplan 2	Zeiss, Jena

Mikroskop-Kamera PowerG3	Canon, Krefeld
Mini-PROTEAN <i>Tetra Cell</i> (Protein-Minigele)	BioRad, München
Neubauer-Zählkammer	Bender&Hobein, Bruchsal
Spannungsgerät EPS 600	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Spektrofluorometer Lambda FLUORO 320	BIO-TEK Instruments, Winooski, USA
Spektrophotometer Multiscan MS	Labsystems, Vienna, USA
Sterile Werkbank Herasafe	Thermo Scientific, Waltham, USA
Waldmann UV-Meter	Waldmann, Villingen-Schwenningen
Waldmann UV-181	Waldmann, Villingen-Schwenningen
Minifuge T (mit freischwingendem Rotor)	Heraeus, Hanau

2.2 Molekularbiologische Methoden

Reaktionsschritte und Inkubationszeiten wurden, wenn nicht anders angegeben, bei RT durchgeführt. Detaillierte Protokolle und verwendete Lösungen sind aus *Molecular Cloning* (Sambrook et al., 1989) entnommen. Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurden chemisch kompetente *E. coli* Bakterien (DH5 α) transformiert. Für die Selektion der transformierten Bakterien wurde dem verwendeten Nährmedium ein Antibiotikum zugesetzt, für welches das jeweilige Plasmid ein Resistenzgen besaß. Zur Erhaltung des Plasmids in der Bakterienzelle enthielten alle nachfolgenden Schritte das erforderliche Antibiotikum in einer Arbeitskonzentration von 50-100 $\mu\text{g/ml}$.

2.2.1 Transformation kompetenter Bakterien

Die Transformation des *E.coli*-Stammes DH5 α erfolgte nach Protokoll der Firma Invitrogen.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

2.2.2.1 Plasmid-Präparation in kleinem Maßstab (DNA MiniPrep)

Für die Präparation von Plasmid DNA in kleinem Maßstab wurde eine 5 ml LB-Übernachtskultur durch Picken einer Bakterien-Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert. Am Folgetag wurde die Plasmid-DNA durch einen alkalischen Zellaufschluss, anschließende Neutralisation und eine Ethanol-Fällung isoliert. Je nach Größe der DNA-Pellets wurde die DNA in 20–50 μl 1x TE gelöst und bei –20°C gelagert. Die Ausbeute lag etwa bei 20 μg pro Präparation.

2.2.2.2 Plasmid-Präparation in großem Maßstab (DNA MaxiPrep)

Zur Präparation von Plasmid-DNA in großen Mengen wurden 500 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer 5 ml LB-Übernachtskultur angeimpft und über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert. Für die Isolierung der Plasmid-DNA wurde das Plasmid-Maxi-Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Vorgehensweise entsprach den Herstellerangaben. Das Prinzip dieses Kits beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse, wobei die Plasmid-DNA an eine Anionenaustauschersäule gebunden und nach Waschschritten durch einen Puffer mit hoher Salzkonzentration von der Säule eluiert wird. Je nach Größe der erhaltenen DNA-Pellets wurde die DNA in 50–200 µl 1x TE gelöst und bei –20°C gelagert. Die Ausbeute lag bei etwa 100 µg pro Präparation.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Trennung von DNA Fragmenten nach Größe eingesetzt. Es wurden TAE-Agarosegele (1-3% (w/v) Agarose und 0,1 µg/ml Ethidiumbromid) verwendet. Bei konstanter Spannung von 70 - 120 V wurden die Fragmente getrennt. Ein DNA-Größenmarker wurde stets zur Größenbestimmung der Fragmente aufgetragen. Ethidiumbromid interkaliert sequenzunspezifisch in doppelsträngige DNA und führt nach Anregung mit UV-Licht zu Emission, welche fotografisch dokumentiert werden kann.

2.2.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Für die Isolation von DNA-Fragmenten aus einem Agarose-Gel wurde das QIAquick Gel Extraction Kit gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt. Zur Kontrolle der Reinheit und der isolierten DNA-Menge wurde ein Aliquot auf einem Agarosegel analysiert.

2.2.5 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage, spezifische DNA-Abschnitte zu erkennen und zu schneiden. In der Regel wurde ein Restriktionsverdau in einem Volumen von 20 µl durchgeführt. Für den Verdau wurden bis zu 2 µg des zu schneidenden Plasmids oder PCR Produkts eingesetzt, 2 µl des 10fach konzentrierten Endonukleasepuffers zugegeben und der Ansatz mit 1-10 Einheiten der entsprechenden Endonuklease(n) versetzt. Zum Auffüllen auf 20 µl wurde Aqua dest. verwendet. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben mindestens 1 h durchgeführt.

2.2.6 Dephosphorylierung von DNA

Nach dem Verdau von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde die Vektor-DNA am 5'-Terminus mittels antarktischer Phosphatase dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors mit sich selbst zu verhindern. Die Klonierungseffizienz kann durch diesen Schritt erheblich gesteigert werden. Nach dem Restriktionsverdau wurden dem Ansatz 1 µl der Phosphatase und die entsprechende Menge des 10fach-konzentrierten Phosphatasepuffers zugegeben. Die DNA wurde 30 Minuten bei 37°C dephosphoryliert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Phosphatase bei 65°C für 5 Minuten.

2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA

Die Ligation von hydrolisierten und dephosphorylierten Plasmiden erfolgte mit T4 DNA Ligase. Diese katalysiert die Knüpfung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA. Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden in einem molaren Verhältnis von 3:1 mit Vektor-DNA nach Herstellerangaben ligiert. Die Ligation erfolgte entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 16°C. Um die Ligationseffizienz zu bestimmen, wurde jeweils ein Ansatz ohne DNA-Fragment, d.h. nur der Vektor verwendet.

2.2.8 Klonierung kutaner E6 oder E7 ORF in den retroviralen Vektor pLXSN

Die verschiedenen E6 oder E7 ORF wurden mit spezifischen Primern aus den jeweiligen HPV Plasmiden kloniert. Die folgenden Polymerasekettenreaktionen (PCR) wurden mit den in Tabelle 2.4 angegebenen Primern, welche am 5' Ende Restriktionsschnittstellen enthalten, in entsprechenden Kombinationen durchgeführt:

Komponenten	finale Konzentration	Volumen pro 25 µl Ansatz
HPV DNA	100 ng	1-4 µl*
dNTPs (2 mM)	0,2 mM	2,5 µl
10x Puffer (inkl. 15mM MgCl ₂)	1x	2,5 µl
Qiagen <i>Taq</i> (5U/µl)	1,5 U	0,3 µl
Vorwärts Primer (100 µmol)	0,5 µM	0,125 µl
Rückwärts Primer (100 µmol)	0,5 µM	0,125 µl
PCR Wasser	-	14,45-18,45 µl*

*Abhängig von der DNA-Konzentration und Qualität

Die PCR-Reaktionen wurden, wie alle nachfolgenden PCR-Reaktionen, mit dem Mastercycler Gradient durchgeführt. Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet:

Start-Denaturierung	2	min	94°C
30 Zyklen:			
Denaturierung	30	s	94°C
Annealing*	1	min	56-62°C
Elongation*	1-2	min	72°C
Termination	4	min	72°C
Abkühlung	∞		4°C

*Die Annealingtemperatur wurde durch die Schmelztemperatur der jeweiligen Primer, die Elongationszeit durch die Fragmentlänge festgelegt. Die verwendete Taq-Polymerase synthetisiert 1 kb in einer Minute.

Die amplifizierte DNA wurde, nach einem präparativen Restriktionsverdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen, im Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel isoliert. Anschließend erfolgte die Ligation mit dem retroviralen Vektor pLXSN. Nach Transformation der Konstrukte in chemisch kompetente *E.coli*-Bakterien wurden die klonierten pLXSN-HPV E6 oder E7-Plasmide durch DNA MaxiPrep gewonnen. Die viralen E6 oder E7 Inserts wurden abschließend mittels eines analytischen Restriktionsverdaus nachgewiesen (Abbildung 2.1) und durch eine Sequenzanalyse (Fa. Eurofins MWG Operon, Ebersberg) verifiziert (Daten nicht gezeigt). Die Nukleotidsequenzen stimmten mit den Angaben der *Gen Bank* überein (Tabelle 2.11).

Tabelle 2.11: Klonierte pLXSN-HPV E6 oder E7-Plasmide

pLXSN-HPV E6 oder E7	<i>Gen Bank/Accession number*</i>
HPV 1 E6	NC_001356
HPV 4 E6	NC_001457
HPV 4 E7	NC_001457
HPV 5 E6	NC_001531
HPV 5 E7	NC_001531
HPV 20 E6	U31778
HPV 20 E7	U31778
HPV 38 E6	U31787
HPV 38 E7	U31787

* *Gen Bank/Accession number* des jeweiligen HPV Typs, verifiziert mit NCBI PubMed.

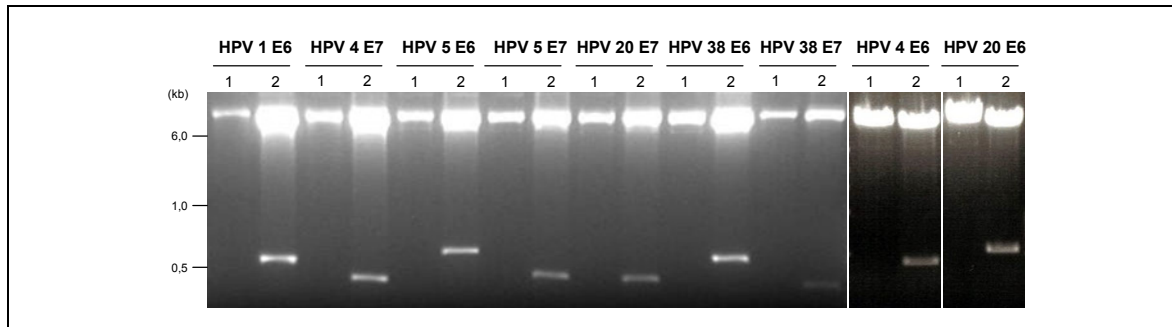


Abbildung 2.1: Analytischer Restriktionsverdau von pLXSN-HPV E6 oder E7.

HPV E6 oder E7 ORF wurden in pLXSN kloniert und die Plasmide mit den entsprechenden Restriktionsenzymen doppelt verdaut. pLXSN-HPV E6 oder E7 (1) unverdaut, (2) nach Doppelverdau. Die Fragmente wurden in einem 1% Agarosegel separiert. Spezifische virale Inserts wurden für alle HPV-Typen erhalten. Marker: 1 kb DNA Leiter. Kb, Kilobasen.

2.2.9 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zellen

Arbeiten mit RNA erforderte RNase-freie Bedingungen und wurde daher mit RNase-freien, gestopften Spitzen und sehr sorgfältig durchgeführt. Für die Präparation der RNA wurde das RNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben verwendet. Mit dieser Methode wurde aus bis zu 5×10^6 Zellen Gesamt-RNA (gRNA) gewonnen. Nach DNase Behandlung mit Deoxyribonuclease (Deoxyribonuclease I Amplification Grade Kit) nach Angaben des Herstellers, wurde die RNA für die Reverse Transkription eingesetzt.

2.2.10 Reverse Transkription mit anschließender Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse-Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) wurde mit dem SuperScript™ First Strand Synthesis System durchgeführt, wobei pro Ansatz 500 ng gRNA eingesetzt wurden. Als Primer dienten Oligo-dT-Primer, die am Poly-A-Schwanz der mRNA binden und Bindungsstellen für Primer bei Amplifizierungen des 3'UTRs beinhaltet. Alle nachfolgenden Reaktionen wurden in einem Reaktionsgefäß (0,2 ml) im Mastercycler Gradient durchgeführt und erfolgten nach dem Protokoll des Herstellers. Nach der Transkription wurde die RNA durch Zugabe von RNase H degradiert. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert und ohne weitere Aufreinigung in PCR Reaktionen eingesetzt. Der zweite Schritt, die Amplifikation spezifischer cDNA-Regionen zum Expressionsnachweis, bestand aus einer PCR. Für diese wurde 1 μl der Gesamt-cDNA aus dem ersten Schritt eingesetzt. Die PCR wurden mit den in Tabelle 2.5 angegebenen HPV-spezifischen Primern in entsprechenden Kombinationen durchgeführt. Folgender Ansatz wurde für die PCR verwendet:

Komponenten	finale Konzentration	Volumen pro 25 µl Ansatz
cDNA		1 µl
dNTPs (2 mM)	0,2 mM	2,5 µl
10x Puffer (inkl. 15mM MgCl ₂)	1x	2,5 µl
Qiagen <i>Taq</i> (5U/µl)	1,5 U	0,3 µl
Vorwärts Primer (100 µmol)	0,5 µM	0,125 µl
Rückwärts Primer (100 µmol)	0,5 µM	0,125 µl
[RPS9 vorwärts Primer (100 µmol)	0,5 µM	0,125 µl
RPS9 rückwärts Primer (100 µmol)	0,5 µM	0,125 µl]
PCR Wasser		18,45 µl

Für die in dieser Arbeit verwendete semiquantitative Analyse wurde zu den spezifischen Primern zusätzlich RPS9-Primer zur Normalisierung der Proben verwendet. Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet:

Start-Denaturierung	2	min	94°C
30 Zyklen:			
Denaturierung	30	sec	94°C
Annealing*	1	min	56-62°C
Elongation*	1-2	min	72°C
Termination	4	min	72°C
Abkühlung	∞		4°C

*Die Annealingtemperatur wurde durch die Schmelztemperatur der jeweiligen Primer, die Elongationszeit durch die Fragmentlänge festgelegt.

2.2.11 hTERT-PCR

Zum Expressionsnachweis der humanen *Telomerase Reverse Transkriptase* (hTERT), einer Untereinheit der humanen Telomerase, wurde eine PCR mit den in Tabelle 2.6 angegebenen Primern durchgeführt. hTERT-Primersequenzen und PCR-Bedingungen wurden aus der Literatur modifiziert, verwendet (Nakamura et al., 1997). Das spezifische PCR-Produkt hat eine Größe von 146 bp. Für die Untersuchungen wurden jeweils infizierte HPK der Passage 3 verwendet.

Komponenten	finale Konzentration	Volumen pro 25 µl Ansatz
cDNA	-	1 µl
dNTPs (2 mM)	0,2 mM	2,5 µl
10x Puffer (inkl. 15mM MgCl ₂)	1x	2,5 µl
Qiagen <i>Taq</i> (5U/µl)	1,5 U	0,3 µl
Vorwärts Primer (100 µmol)	0,5 µM	0,125 µl
Rückwärts Primer (100 µmol)	0,5 µM	0,125 µl
PCR Wasser	-	18,45 µl

Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet:

Start-Denaturierung	2	min	95°C
35 Zyklen:			
Denaturierung	45	sec	95°C
Annealing	30	sec	60°C
Elongation	2	min	72°C
Termination	4	min	72° C
Abkühlung	∞		4°C

2.2.12 Mykoplasmen-PCR

Der Nachweis von Mykoplasmen beruht auf der Amplifikation einer hoch konservierten Region der 16s rRNA im Genom verschiedener Mykoplasmentypen mit den in Tabelle 2.6 angegebenen Primern. Das spezifische PCR-Produkt hat eine Grösse von 270 bp. Eine Positivkontrolle (Zellkulturüberstand einer, mit Mykoplasmen infizierten Zelllinie) wurde mitgeführt.

Komponenten	finale Konzentration	Volumen pro 25 µl Ansatz
Zellkulturüberstand	-	3,0 µl
dNTPs (2 mM)	0,2 mM	2,5 µl
10x Puffer (inkl. 15mM MgCl ₂)	1x	2,5 µl
Qiagen <i>Taq</i> (5U/µl)	1,0 U	0,2 µl
Vorwärts Primer (100 µmol)	0,8 µM	0,2 µl
Rückwärts Primer (100 µmol)	0,8 µM	0,2 µl
PCR Wasser	-	16,4 µl

Folgendes Temperaturprogramm wurde verwendet:

Start-Denaturierung	10	min	95°C
39 Zyklen:			
Denaturierung	45	sec	95°C
Annealing	45	sec	55°C
Elongation	45	sec	72°C
Termination	10	min	72°C
Abkühlung	∞		4°C

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung eukaryonter Zelllinien

2.3.1.1 Allgemeine Arbeitsbedingungen

Das Arbeiten mit Säugerzelllinien erfordert sterile Bedingungen, um Kontaminationen mit Bakterien oder Hefen zu vermeiden. Dazu wurden alle Zellarbeiten an dafür vorgesehenen Werkbänken unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.3.1.2 Kulturbedingungen

Eukaryonte Zelllinien wurden als adhärent wachsende Kulturen in Zellkulturflaschen aus Kunststoff bei 37°C und 5% CO₂ in einem Brutschrank bei 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Als Kulturmedium diente DMEM („*Dulbecco's modified Eagle Medium*“), dem 10% fetales Kälberserum (FCS, hitzeinaktiviert 30 min bei 56°C) und 1% *Antibiotic-Antimycotic Solution* zugesetzt wurden. Vor Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurden die Kulturen routinemäßig geteilt. Dazu wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C inkubiert, bis die Zellen sich makroskopisch ablösten. Die Trypsinierung wurde mit Kulturmedium gestoppt und die Zellsuspension 1:3 bis 1:10 verdünnt ausgesät.

2.3.1.3 Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA von der Matrix der Kulturschale gelöst. Die Zellen wurden in Medium aufgenommen und abzentrifugiert (1000 rpm, 5 min), mit PBS gewasche und nach dem Entfernen des Überstandes in Einfriermedium (Vollmedium mit 10% DMSO) resuspendiert und in Einfrierröhrchen überführt. Nach einer eintägigen Lagerung der Zellen bei -80°C wurden die Zellen langfristig in N₂ (gasförmige Phase) aufbewahrt. Das Auftauen der Zellen wurde

schnell durchgeführt: Die Zellen wurden in einem 37°C Wasserbad aufgetaut, abzentrifugiert (1000 rpm, 5 min), mit PBS gewaschen, anschließend in vorgewärmtes Medium aufgenommen und in entsprechenden Kulturflaschen ausgesät.

2.3.1.4 Nachweis von Mycoplasmen

Mycoplasmen sind parasitär, intra- und extrazellulär lebende Bakterien, deren Kontaminationen in Zellkulturen Ergebnisse verfälschen können. Zum Nachweis von Mycoplasmen wurden routinemäßige 14 tägig 2 ml des jeweiligen Zellkulturmediums abgenommen, bei -20°C gelagert und 3 µl als DNA-Vorlage in einer Mycoplasmen-PCR (Abschnitt 2.2.12) eingesetzt.

2.3.2 Isolierung von HPK und HPF aus Hautgewebe

Brusthautgewebe, kaukasischer Patienten, welches routinemässig im Rahmen von Schönheitsoperationen entfernt worden war, wurde bis zur Aufarbeitung in Transportmedium (Keratinocytenmedium, 1% „Antibiotic-Antimycotic Solution“) bei 4°C gelagert. Es erfolgte ein Waschschrift mit PBS und die Entfernung subkutanen Fettgewebes. Dann wurde das Gewebe mittels eines Skalpells in schmale (max. 1,5 cm breit, 4 cm lang) longitudinale Streifen geschnitten, die wiederum im 90 Grad Winkel, ähnlich eines Kammes, alle 2 mm eingeschnitten wurden. Die bearbeiteten Streifen wurden in ein 50 ml Falconröhrchen überführt, anschließend mit Dispaselösung (2,4 U/ml in PBS) bedeckt bei 4°C ü.N. inkubiert. Am Folgetag wurden die Gewebestreifen in eine mit PBS gefüllte Petrischale gegeben. Mittels einer feinen Pinzette wurde die Epidermis abgezupft. Die bräunlichen Epidermisstücke wurden in ein separates Falconröhrchen mit PBS gegeben und 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das PBS abgenommen und 0,25% Trypsin Lösung (ca. 20 ml) zugegeben. Die Epidermis wurde für 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert, wobei alle 5 min stark gevortext wurde. Nach Zugabe derselben Menge Trypsin-Inhibitor (1 mg/ml), zur Neutralisation des Trypsins, wurde die Zellsuspension durch Falcon Zellsiebe (100 µm und anschließend 40 µm) passiert. Das Filtrat (eine Zellsuspension hochangereichert mit HPK) wurde 10 min bei 900 rpm zentrifugiert. Die Keratinocyten wurden anschließend in Keratinocytenmedium resuspendiert und je 3×10^7 Zellen in 75 cm², mit Kollagenase beschichtete, Kulturflaschen gegeben. Zur Gewinnung primärer Fibroblasten wurde die verbliebene Dermis mittels Schere und Skalpell mechanisch zerkleinert, in ein Falconröhrchen gegeben und in 15 ml Kollagenase D-Lösung (0,03 g auf 60 ml DMEM) 1-2 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Fibroblastensuspension wurde ebenfalls gesiebt und das Filtrat pelletiert. Das Zellpellet wurde in DMEM (10% FCS) resuspendiert und je 5×10^7 Fibroblasten in 175 cm² Zellkulturflaschen kultiviert.

Tabelle 2.12: Verwendete Patientenproben und durchgeführte Untersuchungen

Alter [Jahre]	Geschlecht	Gewebe	Untersuchungen
20	w	Brust	Immortalisierungsuntersuchungen h-TERT Untersuchungen
24	w	Brust	Invasionsuntersuchungen
21	m	Brust	Organotypische Hautkulturen
24	w	Brust	Bak Untersuchungen

w, weiblich; m männlich

2.3.3 Kultivierung von HPK

2.3.3.1 Kulturbedingungen und Passagieren

Primärkulturen von HPK wurden in Keratinozytenmedium bei 37°C und 5% CO₂ gehalten. Zum Passagieren wurden die 70% bis 90% konfluent gewachsenen Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA bei RT inkubiert. Nach einigen Minuten wurde vorsichtig gegen die Zellkulturflasche geklopft bis sich nahezu alle Zellen vom Boden gelöst hatten. Die abgelösten Zellen wurden mit demselben Volumen an Trypsin-Inhibitor (1 mg/ml) versetzt, mit PBS gewaschen und je nach Dichtegrad in frischem Medium ausgesät. Zellzählungen erfolgten mit dem Casy 1 *cellcounter* bzw. mit einer Neubauer Zählkammer. Die Zellvitalität wurde routinemäßig mit Trypanblaufärbung oder automatisch mit dem Casy 1 *cellcounter* überprüft.

2.3.3.2 Einfrieren und Auftauen

Die Zellen wurden nach subkonfluenten Wachstum abtrysiniert, mit PBS gewaschen und 10 min bei 1000 rpm pelletiert. 2-5x 10⁶ Zellen wurden in 2 ml *Cryo*-SFM-Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden im Mr. Frosty, einem mit Isopropanol isolierten Behälter, über 24 h langsam auf -80°C (1°C/min) abgekühlt und anschließend in N₂ (gasförmige Phase) gelagert. Eingefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, mit PBS gewaschen, in 10 ml Medium aufgenommen und 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

2.3.4 Bestrahlung humaner Zelllinien

2.3.4.1 Das Waldmann UV-181 Bestrahlungsgerät

Für UV-B Bestrahlungen der Keratinozyten wurde ein Waldmann UV-181 Bestrahlungsgerät verwendet. Die aktuelle Leistung der UV 6 Kompaktstrahler (Emissionspeak 320 nm) wurde werkseitig vor Auslieferung gemessen und vor Beginn der Bestrahlungen nochmals mit einem Waldmann UV-Meter bestätigt. Die Direkteingabe von Dosiswerten erfolgte in J/cm^2 ($60 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ entspricht beispielsweise $0,006 \text{ J}/\text{cm}^2$) über das Tastaturfeld des Bestrahlungsgerätes.

2.3.4.2 UV-B Bestrahlung von HPK

In 10 cm Schalen kultivierte HPK wurden vor der UV-B Bestrahlung mit PBS gewaschen, in der Mitte der Bestrahlungsfläche positioniert und mit einer UV-B Dosis von $25 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit 10 ml Keratinozytenmedium bis zur Ernte weiter kultiviert.

2.3.5 Herstellung rekombinanter Retroviren mit dem Retro X-System

Mit dem Retro X-System können rekombinante infektiöse, aber replikationsinkompetente Retroviren hergestellt werden (Abbildung 2.2). So ist es möglich, ein fremdes Gen in eine Vielzahl verschiedener Säugerzellen einzubringen und stabil in das Wirtsgenom proliferierender Zellen zu integrieren. Die Integration erfolgt über die LTR-Integrationssequenzen, die gleichzeitig als Promotoren für das Fremdgen fungieren (Naviaux und Verma, 1992). Das System besteht aus der Verpackungszelllinie pT67, die auf der Mausfibroblastenzelllinie NIH/3T3 basiert und die Strukturgene gag, pol und env des MoMuLV Typ 10A1 in ihr Genom integriert hat und einem retroviralen Vektor. Als Verpackungszelllinie wurde in den hier beschriebenen Experimenten pT67, als retroviraler Vektor pLXSN verwendet. Dieser wurde mittels des Transfektionsreagenzes *FuGene6* in die Verpackungszelllinie transfiziert. Der Vektor pLXSN besitzt neben den 5'- und 3'-LTR, das amphotrophe Verpackungssignal Ψ^+ , welches in Kombination mit den gag-, pol- und env-Genen der Verpackungszelllinie rekombinante Viren produziert. Diese Viren können ein breites Spektrum an Säugerzellen infizieren.

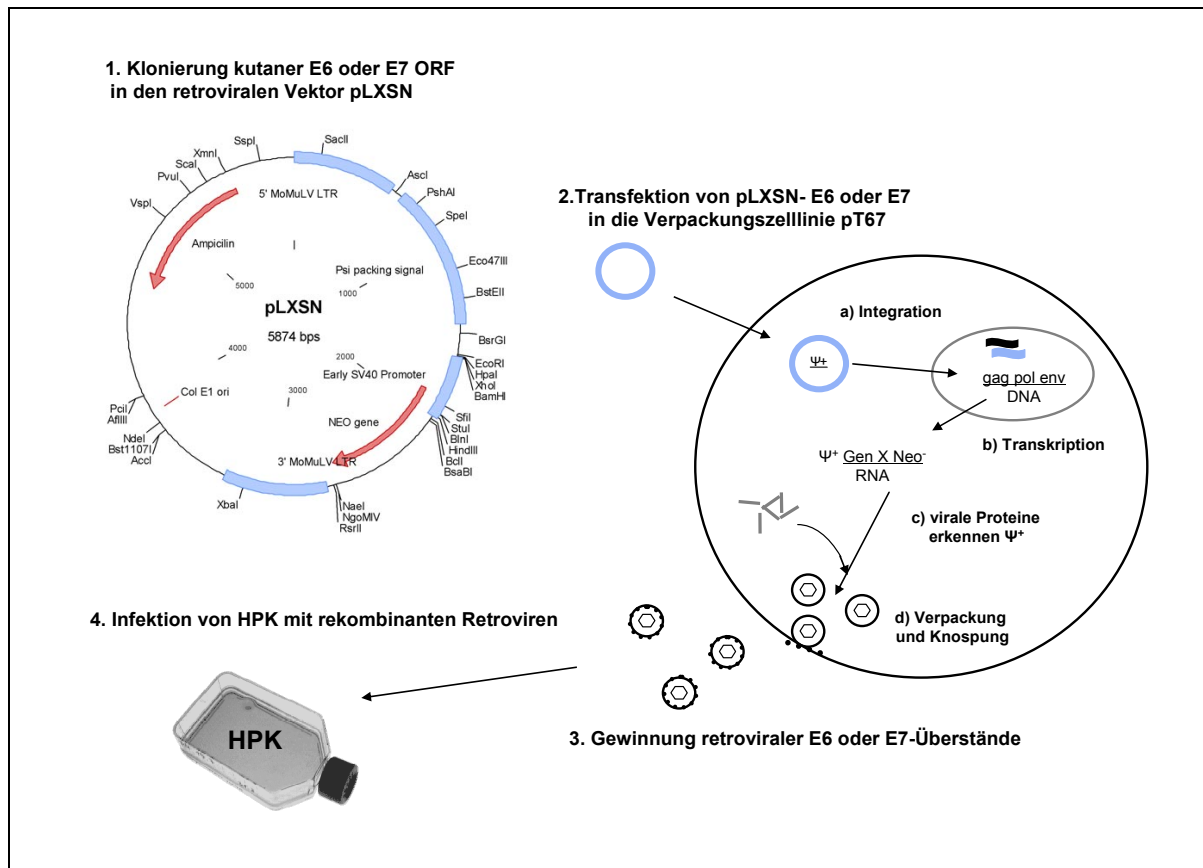


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Herstellung rekombinanter Retroviren und Infektion von HPK mit dem Retro X-System.

Kutane E6 oder E7 ORF wurden in den retroviralen Vektor pLXSN kloniert (1) und in die Verpackungszelllinie pT67 transfiziert (2). Hier integriert die Vektor-DNA in das Genom (a) und wird in RNA transkribiert (b). Die virale RNA wird verpackt (c) und mittels Knospung ins Kulturmedium abgegeben (d). Die retroviralen Überstände werden filtriert und bei -80°C gelagert (3). Abschließend werden HPK mit diesen rekombinanten Retroviren infiziert (4).

Um sicher zu stellen, daß keine replikationskompetenten Viren durch Rekombinationsereignisse während der Zellproliferation entstehen, wurden Kontrollexperimente durchgeführt. Zum einen wurden HeLa und NIH/3T3 Zellen für 3 Tage mit Zellkulturüberständen infizierter selektionierter HPK inkubiert und anschließend 7 Tage mit G418 (500 $\mu\text{g/ml}$) selektioniert. HeLa und NIH/3T3 Zellen starben ab. Auch mittels PCR wurden keine Neomycin-Sequenzen, möglicherweise integrierter Retroviren, in HeLa bzw. NIH/3T3 Zellen amplifiziert (Daten nicht gezeigt). Es kann also davon ausgegangen werden, daß mittels des gewählten Retro X-Systems replikationsinkompetente Viren erzeugt und verwendet wurden.

2.3.5.1 Transfektion von pLXSN-HPV E6 oder E7 in pT67 und Gewinnung viraler Überstände

Die Verpackungszelllinie pT67 wurde mit 15 ml Kulturmedium in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert und in subkonfluentem Zustand mit verschiedener pLXSN-HPV E6 oder E7 Plasmid-DNA transfiziert. Am Tag der Transfektion wurden pro Ansatz 3 µl *FuGene6* zu 97 µl DMEM in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben, resuspendiert und für 10 min inkubiert. Diese Mischung wurde anschließend tropfenweise in ein zweites 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 1-2 µg vorpipettierter pLXSN-HPV Plasmid-DNA gegeben. Das Gemisch wurde für weitere 20 min bei RT inkubiert. Von den pT67 wurde die Hälfte des Mediums abgenommen, die DNA/*FuGene6*-Lösung tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert und anschließend für 5-7 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 5 ml frisches Kulturmedium dazu gegeben und die Zellen weiter bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. 48 h nach der Transfektion begann die Selektion der transfizierten pT67 mit Genitizin (G418, 500 µg/ml). Alle 2-3 Tagen wurde das mit G418 versetzte Kulturmedium erneuert. Als Positivkontrolle wurden nichttransfizierte pT67 mitgeführt. Um eine Population 100% transfizierter Zellen zu erhalten, wurde eine etwa einwöchige Selektion mit G418 durchgeführt und die selektionierten pT67-Zellklone anschließend gepoolt expandiert. pT67 produziert infektiöse, nicht replikationsfähige Retroviren, die ins Kulturmedium abgesondert werden. Zur Gewinnung der Virusüberstände wurden die jeweiligen pT67-Zelllinien in 175 cm² Zellkulturflaschen mit 30 ml Medium kultiviert. Bei einer Konfluenz von etwa 80-90% wurde das Medium abgezogen und durch 16 ml frisches Kulturmedium ersetzt. Die Zellen wurden nun bei 32°C und 5% CO₂ inkubiert. Die retroviralen Überstände wurden 24 h später abgenommen, filtriert (0,45 µm), in 4 ml Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.3.6 Infektion von HPK mit rekombinanten Retroviren

Die zu infizierenden primären Keratinozyten wurden 48 h vor der Infektion mit einer Dichte von 2×10^5 /T25 Kulturflaschen in Keratinozytenmedium ausgesät. Zur Infektion wurde das Medium der Keratinozyten abgenommen und durch serumfreies DMEM mit Polybrene (5 µg/ml Endkonzentration) ersetzt. Die Zellen wurden für 10 min bei 37°C vorinkubiert, zwischenzeitlich die retroviralen Überstände (je 4 ml) aufgetaut und mit Polybrene (5 µg/ml Endkonzentration) versetzt. Danach wurde das Kulturmedium der Zellen abgenommen und durch die präparierten Überstände ersetzt. Die Kulturflaschen wurden nun 1 h mit 350 g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Keratinozytenmedium weiter kultiviert. Nach 48 bis 72 h schloss sich eine ca. fünftägige Selektion mit G418 (100 µg/ml Medium) an. Als Positivkontrolle wurden nichttransfizierte HPK mitgeführt. Anschließend wurden die selektionierten Zellklone gepoolt, weiter expandiert und für Untersuchungen verwendet.

2.3.7 Langzeitkultur zur Immortalisierung infizierter HPK

Um mit E6 oder E7 infizierte HPK zu immortalisieren, wurden diese langzeitkultiviert. Die Untersuchungen erfolgten jeweils im Dreieransatz. Infizierte HPK wurden in Passage 3 mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen in T25 Kulturflaschen in Keratinozytenmedium ausgesät. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80% wurden die Zellen trypsiniert und mit dem Casy 1 *cellcounter* gezählt. Anschließend wurden wiederum 1×10^5 Zellen in frische T25 Kulturflaschen in Keratinozytenmedium ausgesät. Dieser Modus wurde bis zum Absterben der Zellen beibehalten. Ermittelte Zellzahlen wurden dokumentiert und die Populationsverdopplungen (*population doublings*, PD) wie folgt berechnet:

Primäre Zellen vermehren sich durch exponentielles Wachstum. Ausgehend von einer einfachen Teilung der Mutterzelle in zwei Tochterzellen ergibt sich mathematisch:

$$N = N_0 2^n$$

wobei N die Endzellzahl (gezählte Zellzahl), N_0 die Anfangszellzahl (ausgesäte Zellzahl) und n die Anzahl der Generationen ist, die während des exponentiellen Wachstums durchlaufen wird. Die Anzahl der Generationen n wird auch als PD bezeichnet. Nach n aufgelöst ergibt sich folgende Gleichung:

$$n \text{ (PD)} = (\log_{10} N - \log_{10} N_0) / \log_{10} 2$$

Die PD wurden jeweils für die verschiedenen infizierten HPK berechnet. Um PD darzustellen, wurde deren Mittelwert errechnet, die PD über die Kulturdauer für HPV E6 oder E7 addiert und die erhaltenen Werte gegen die Zeit, in einem Diagramm, aufgetragen. Dabei ist der Tag 0 der Zeitpunkt an dem die infizierten HPK ausgesät wurden.

2.3.8 Invasionstest mit infizierten HPK

Um die Invasionsfähigkeit infizierter HPK zu untersuchen, wurde ein MatrigelTM-Invasionstest, mittels BD Falcon HTS FluoroblokTM Inserts, verwendet. Diese Methode zur Quantifizierung des Invasionspotenzials von Zellen, durch eine Basalmenbran-ähnliche Substanz, mittels des sogenannten "*Boyden chamber assay*" wurde erstmals von Albini beschrieben (Albini et al., 1987). Der hier verwendete Test ist ein *in vitro* Assay, um die Migration von Zellen durch ihre natürliche Barriere zu beobachten und zu quantifizieren. Matrigel ist eine lösliche Präparation aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Sarkom. Die Zusammensetzung aus Laminin, Kollagen IV und weiteren Substanzen ähnelt der humanen Basalmembran, welche *in vivo* von invadierenden Keratinozyten überwunden werden kann. Die Auswertung der Zellinvasion erfolgte photometrisch über die Anfärbung gewanderter Zellen mit Calcein-AM. Dieses membranpermeable Molekül wird im Inneren einer intakten, vitalen Zelle in Calcein umgewandelt, was in einer starken, grünen Fluoreszenz resultiert.

In einem Vorversuch wurde analysiert, ob SCL-II Zellen durch Matrigel invadieren und dementsprechend als Pk geeignet sind. Nach 24 h waren die SCL-II Zellen häufiger durch

unbeschichtete, als durch die mit Matrigel™ beschichteten Fluoroblok™-Einsätze (Abbildung 2.3) eingewandert. Im Vergleich zu NIH/3T3-Zellen (in der Literatur beschriebene Negativkontrolle) sind einzelne SCL-II-Zellen nach 24 h invasiv durch die Poren der Matrigel Fluoroblok-Einsätze gewandert.

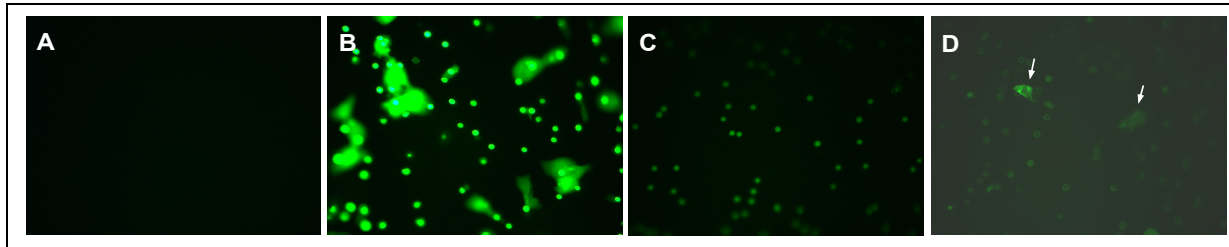


Abbildung 2.3: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Invasion von SCL-II Zellen (Vorversuch zum Matrigel-Invasionsassay).

Jeweils 150.000 Zellen wurden in mit Matrigel beschichteten Fluoroblok-Einsätzen für 24 h inkubiert und anschließend mit Calcein-AM gefärbt und an der Unterseite der Fluoroblok-Einsätze fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert. A SCL-II ohne Calcein-AM B SCL-II ohne Matrigel C NIH/3T3 mit Matrigel D SCL-II mit Matrigel. SCL-II wachsen nach 24 h durch die Matrigelbeschichtung (Pfeile), NIH/3T3 sind nicht invasiv.

An Tag 1 erfolgte der Austausch des Kulturmediums, für die semikonfluent gewachsenen Zelllinien SCL-II (Pk) sowie NIH/3T3 (Nk), auf serumfreies DMEM mit 0,2% BSA, um eine Synkronisation der Zellen zu erreichen. Infizierte HPK später Passagen wuchsen bereits semikonfluent in serumfreiem Medium. BD Falcon HTS Fluoroblok™ Einsätze wurden ü.N. bei 4°C aufgetaut und anschließend für 2 h in serumfreiem DMEM mit 0,2% BSA rehydriert. An Tag 2 wurden die mit E6 oder E7 infizierten HPK sowie die SCL-II und NIH/3T3 trypsiniert, zweimal in PBS gewaschen und mit dem jeweiligen serumfreien Medium auf 1×10^6 Zellen/ml Medium resuspendiert und in 50 ml Falconröhrchen bei 4°C bereitgestellt. Jeweils 600 µl des Kulturmedium, mit 10% FCS als Chemotaxin, wurden in die Wells einer 24-Well Platte gegeben. Anschließend wurden je 150 µl der vorbereiteten Zellsuspension (entspricht 150.000 Zellen) in die mit Matrigel beschichteten Fluoroblok Einsätze gegeben, diese in den Wells plaziert und die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit Calcein AM gefärbt. Das FCS-haltige Medium wurde aus den Wells entfernt und durch 600 µl einer 5 µM Calcein-AM Lösung ersetzt. Die Fluoroblok™ Einsätze wurden nun in der Calcein-AM Lösung für 30 min bei 37°C, in Alufolie, inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen und frisches serumfreies Kulturmedium in die Wells gegeben. Die Fluoreszenzemission gewandelter Zellen an der Unterseite der Fluoroblok™ Einsätze wurde nach 24 h mit dem Spektrofluorometer bei 485 nm bestimmt. Dabei wurden adhärenente Zellen an der Unterseite der Fluoroblok-Einsätze berücksichtigt, nicht jedoch Zellen im Medium. Die Untersuchungen erfolgten zweimal, jeweils im Doppelansatz. Für die Datenauswertung wurden die gemessenen Werte gemittelt, der Blankwert (Fluoroblok-Einsätze mit Kulturmedium, ohne Zellen) abgezogen und die erhaltenen Werte in einem Diagramm aufgetragen.

2.3.9 Organotypische Hautkulturen („raft-culture“) mit infizierten HPK

In Glycerol gelagerte Spenderhaut, bestehend aus Epidermis und Dermis, wurde zweimal mit PBS gewaschen und 10 Tage in antibiotikahaltigem PBS, (1% *Antibiotic-Antimycotic Solution*) bei 37°C gelagert. Das antibiotikahaltige PBS wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Epidermis mittels eines Skalpells abgeschabt. Die Dermis wurde mehrmals mit PBS gespült und dann in 1,5 x 1,5 cm große Quadrate geschnitten, die in 6 Well-Platten positioniert wurden. Auf das *Stratum reticulare* (Unterseite der Dermis) wurden nun jeweils ein Edelstahlring (Durchmesser: 1,2 cm) positioniert. Anschließend wurden primäre, humane Fibroblasten geerntet, gezählt und in RM+ Medium auf eine Zellzahl von 5×10^5 Zellen/ml eingestellt. 1 ml dieser Suspension wurde in den vorbereiteten Ring pipettiert, zusätzlich 4 ml RM+ Medium in das Well gegeben und über Nacht bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium abgezogen, der Edelstahlring entfernt und auf das *Stratum papillare* (Oberseite der Dermis) möglichst deckungsgleich positioniert. In Keratinozytenmedium kultivierte infizierte HPK wurden geerntet, ausgezählt und auf eine Konzentration von $3,5 \times 10^5$ Zellen/ml in RM+ Medium eingestellt. 1 ml dieser Suspension wurde in den Ring gegeben und das Well mit 4 ml RM+ Medium befüllt. Am folgenden Tag wurde der Ring entfernt. Als Konfluenzkontrolle wurde jeweils ein Well (Durchmesser ebenfalls 1,2 cm) einer 24 Well-Platte mit ebenfalls $3,5 \times 10^5$ Keratinozyten kultiviert. Nach Erreichen von ca. 95% Konfluenz im Kontrollwell wurde die Dermis 4 bis 6 h in frischem RM+ Medium inkubiert. Danach setzte man die Dermis, in 6 Well-Platten, auf Edelstahlgitter. Es wurde gerade soviel RM+ Medium in die Schale gegeben, dass die Dermis von unten benetzt und wie ein Floß (*engl.: raft*) im Medium positioniert war. An jedem zweiten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Am 10. Tag wurden die Hautkulturen für 2 h mit BrdU (50 µM) versetztem RM+ Medium inkubiert. Die Fixierung erfolgte für 24 h in 4% gepuffertem Paraformaldehyd (PFA), anschließend wurden die organotypischen Hautkulturen in Paraffin eingebettet. Zur immunhistochemischen Untersuchung wurden 4 µm Paraffinschnitte angefertigt und auf entsprechende Objektträger aufgebracht. Jeweils vier Schnitte wurden mit spezifischen monoklonalen Antikörpern, sowie ohne Primärantikörper als Negativkontrolle inkubiert und mikroskopisch ausgewertet.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Präparation von Gesamtzellextrakten

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von dem Kulturschalenboden abgelöst. Das Zell-Medium-Gemisch wurde in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und bei 1.200 rpm und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 1 ml kaltem PBS gewaschen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gefüllt. Nach erneuter Zentrifugation bei 3000 rpm, 4°C und 3 min lang, wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in ca. 3fachem Volumen an Lysepuffer resuspendiert und 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurde das Proteinlysate für 5 min sonifiziert, um die genomische DNA zu zerstören. Durch Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C wurden unlösliche Trümmer sedimentiert. Der Proteinüberstand wurde in ein frisches vorgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Vor dem Auftrennen des Proteingemischs mittels SDS-PAGE wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Überschüssige Proteinlysate wurden mit SDS-Probenpuffer versehen und nach dem Aufkochen (5 min, 95°C) bei -80°C gelagert.

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in Gesamtzellextrakten wurde der BCA Protein Assay Kit verwendet. Hierbei handelt es sich um einen auf Bicinchonsäure (BCA) basierenden Farbnachweis zum Nachweis und Quantifizierung von Proteinen. Diese Methode verbindet die Reduktion von Cu^{+2} zu Cu^{+1} durch Proteine in alkalischer Umgebung mit einer hochsensitiven Farbnachweis von Kupferkationen (Cu^{+1}) durch eine Lösung mit Bicinchonsäure (Smith et al., 1985). Die BCA-Moleküle bilden einen Komplex mit den reduzierten Kupferionen, was zu einer violetten Verfärbung führt, welche bei einer Wellenlänge von 570 nm am Spektrophotometer Multiscan MS gemessen wurde. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung der Proteine nach Größe wurde die SDS-PAGE eingesetzt (Laemmli, 1970). Es wurden 12%ige Acrylamid-Trenngele mit einem 5%igen Acrylamid-Sammelgel verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in einer Kammer des ProteanII Tetra Cell Systems. Die Zusammensetzung der Gele und des Laufpuffers sind in Abschnitt 2.1.8 angegeben. Nach dem Gießen des Trenngels wurde das Gel zur Polymerisation mit Isopropanol überschichtet. Anschließend wurde der Alkohol abgegossen, mit ddH_2O gespült und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Vor der Beladung mittels einer Hamilton-Pipette wurden die Proteinlösungen mit SDS Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Der Lauf

erfolgte bis zum Einlaufen in das Trenngel bei 80 V und während der Auftrennungsphase bei 120 V.

2.4.4 Western Blot-Analyse

Die *Western Blot*-Analyse wird für den Nachweis von Proteinen mittels spezifischer Antikörper verwendet. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE nach der Größe aufgetrennt und anschließend mit einer Blotapparatur (*semidry*) auf eine PVDF-Membran übertragen. Zuerst wurden drei Whatman-Papiere, in dem entsprechenden Blotpuffer getränkt, auf der Blotapparatur platziert. Die Membran wurde mit Methanol benetzt und anschließend in Blotpuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Membran auf das Whatman-Papier aufgebracht, das Gel darauf gelegt und abschließend nochmals drei mit Puffer getränkte Whatman-Papiere darübergeschichtet. Der Proteintransfer erfolgte 40-60 min bei konstanten 6-12 V. Zur Absättigung freier Antikörperbindestellen wurde die Membran mindestens 1 h bei RT in Blocklösung geschüttelt. Anschließend wurde die Membran mit dem Erstantikörper inkubiert. Im Folgenden wurde die Membran dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen, um überschüssige Antikörperlösung zu entfernen. Die Inkubation der Membran mit dem Zweitantikörper erfolgte 1 h bei RT. Anschließend wurde erneut dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Visualisierung der Protein-Antikörperkomplexe erfolgte durch Chemilumineszenz unter Verwendung der SuperSignal West Ultra Dura / Femto-ECL Substrate. Die Signale wurden mit Röntgenfilmen detektiert.

2.4.5 Immunhistochemische Untersuchungen

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden mit einem Mikrotom 4 µm dicke Schnitte der Paraffinblöcke angefertigt. Die einzelnen Schnitte wurden in einem Wasserbad bei 56°C geglättet auf Adhäsiv-Objektträger aufgezogen und bei 56°C 2 h getrocknet. Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Schnitte erfolgte durch serielle Inkubation für jeweils 5 min in einem Tauchbad von 100%igem Xylol (I) und (II), Xylol/ Ethanol 1:2, 100% Ethanol, 90% und 70%igem Ethanol bei RT. Anschließend wurden die Präparate in destilliertem Wasser für 10 min belassen und dann für 10 min in kaltem H₂O₂ (3% in Methanol) zur Absättigung der endogenen Peroxidase inkubiert. Vor der Immunfärbung wurden die Paraffinschnitte in vorgekochtem Zitratpuffer (10 mM, pH 6.0) für 20-30 min in einem Dampfdrucktopf aufgeköcht, um durch die Fixierung veränderte Epitope zu demaskieren. Nach Abkühlung der Schnitte auf RT wurden sie zweimal für 5 min in TBS gespült. Alle Inkubationen der Objektträger mit Antikörpern und Enzym-Konjugaten wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Um unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper abzusättigen, wurden die Schnitte mit normalem IgG-Ziegen Serum (10%ig in TBS) für 30 min blockiert. Anschließend wurden je 100 µl der Antikörperlösung auf die Schnitte getropft und bei RT für 1 h oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden

die Schnitte dreimal für je 5 min in TBS gespült. Die Darstellung der Antikörper-Antigen-Komplexe erfolgte einerseits, mittels der „markierten Avidin-Biotin-Methode“, mit dem LSAB2-Kit nach Angaben des Herstellers. Als Chromogen für die Peroxidase wurde AEC verwendet, welches in einem roten Farbumschlag resultiert. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte 5-10 min in saurem Hämalaun inkubiert und für 10 min unter fließendem Leitungswasser gespült. Abschließend wurden jeweils etwa 100 µl Kaisers Glyceringelatine, die im Mikrowellenherd auf 50°C erwärmt worden war, über die Gewebsschnitte geschichtet und je ein Deckglas aufgebracht. Für Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen wurden andererseits Zweitantikörper verwendet, welche mit verschiedenen Chromophoren gekoppelt waren. Primärantikörper wurden gleichzeitig, wie oben beschrieben, eingesetzt. Die Zweitantikörper wurden ebenfalls gemischt und im Dunkeln 1 h inkubiert. Das Einbetten der Gewebeschnitte erfolgte mit *Fluorescent mounting medium*, dem DAPI zur Anfärbung der DNA, direkt zugeben wurden (Endkonzentration: 0,5 µg/ml). Bei jeder Serie von Färbungen wurde jeweils eine Positivkontrolle mitgeführt, um sicherzustellen, dass ein negatives Ergebnis nicht aufgrund einer fehlerhaften Anwendung der Methode entstanden war. Entsprechend wurde auch parallel eine Negativkontrolle eingesetzt, d.h. der spezifische Antikörper wurde nicht zugegeben. Die Auswertung der immunhistologisch gefärbten Schnitte erfolgte mit dem Zeiss Axioplan2-Mikroskop sowohl in Hellfeld als auch in Fluoreszenz.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden molekulare Transformationsmechanismen der Gene E6 oder E7 kutaner HPV *in vitro* identifiziert, um ihre potentielle Rolle in der Hautkarzinogenese besser zu verstehen. Möglicherweise kann so auch eine Einteilung hinsichtlich des Risikopotentials kutaner HPV für die Entstehung von NMSC vorgenommen werden, wie sie bereits für mukosale HPV existiert.

Dazu wurden HPK der adulten Haut mit den E6 oder E7 ORF verschiedener kutaner HPV-Typen infiziert (Tabelle 3.1). Die Infektion erfolgte mit einem retroviralen Vektorsystem, da Fremdgene so stabil, unter der Kontrolle des viralen 5'-LTR Promotors, in primären Zellen exprimiert werden. Folgende HPV-Typen, welche mit verschiedenen kutanen Läsionen assoziiert sind, wurden untersucht:

Tabelle 3.1: Untersuchte kutane HPV-Typen verschiedener Taxa

HPV Typ	Taxa	Assoziierte Läsion(en)
HPV 1	mu	Benigne kutane Warzen (Jablonska et al., 1979)
HPV 4	gamma	Kutane Warzen, primäre kutane SCC und abgeleitete Metastasen (Nindl et al., 2006)
HPV 5	beta	AK und primäre kutane SCC immunsupprimierter und immunkompetenter (EV) Patienten (Boxman et al., 1999; Boyle et al., 1984; Elbel et al., 1997; Euvrard et al., 2003; Harwood et al., 2000; Köhler et al., 2007; Meyer et al., 2003; Nindl et al., 2006; Pfister et al., 2003)
HPV 8	beta	
HPV 20	beta	
HPV 38	beta	
RTRX7*	beta	

* Aus Präkanzerosen und SCC eines nierentransplantierten Patienten isoliert (Hopfl et al., 1997). Es wurde kein RTRX7 E6 verwendet; RTRX, *renal transplant recipients*; EV, *Epidermodyplasia verruciformis*

Als Positivkontrolle (Pk) wurde das mukosale HPV 16 (HR alpha-HPV) eingesetzt. Der retrovirale Leervektor pLXSN wurden als Negativkontrolle (Nk) verwendet. Die mit HPV E6 oder E7 infizierten HPK wurden in verschiedenen funktionellen Analysen als einschichtige Zellen, sowie in sogenannten „Organotypischen Hautkulturen“ untersucht.

3.1 Untersuchungen zur HPV E6 oder E7 Expression in HPK

3.1.1 E6 oder E7 RNA wird in infizierten HPK exprimiert

Für alle in den nachfolgenden Abschnitten beschriebenen Untersuchungen wurden HPK infiziert und selektioniert. Vor den jeweiligen Experimenten wurde die Anwesenheit von HPV E6- oder E7-mRNA analysiert, um sicher zu stellen, dass mögliche beobachtete Effekte auf die Expression der viralen Gene zurückzuführen sind.

Hierfür wurde RNA aus den undifferenzierten infizierten HPK extrahiert, in cDNA umgeschrieben und eine HPV E6 oder E7 typenspezifische PCR-Analyse durchgeführt (Abschnitt 2.2.10). In allen infizierten HPK-Zelllinien wurde E6 oder E7 spezifisch transkribiert (Abbildung 3.1, exemplarisch gezeigt).

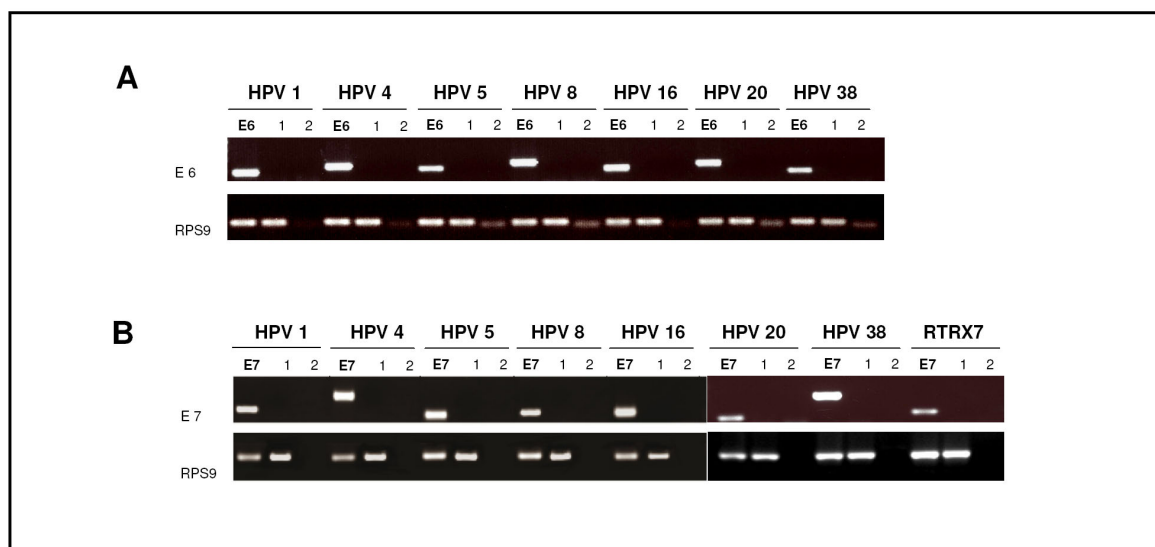


Abbildung 3.1: Expression von HPV E6- oder E7-mRNA in infizierten HPK.

Mittels RT-PCR wurden RNA Expressionsuntersuchungen mit **(A)** HPV E6 (RTRX7 E6 wurde nicht verwendet) oder **(B)** HPV E7 spezifischen Primern durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden jeweils pLXSN-cDNA als DNA-Template (1), und RNA ohne reverse Transkriptase (2) verwendet. Zur Normalisierung wurde das ribosomale Protein RPS9 (U14971; 86 bp) eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem 3% Agarosegel separiert. In allen infizierten HPK-Zelllinien wurde HPV E6- oder E7-mRNA spezifisch exprimiert.

3.1.2 Das E6 oder E7-Protein wird in infizierten HPK exprimiert

Basierend auf dem Nachweis der RNA-Expression wurde untersucht, ob HPV E6 oder E7 auch auf Proteinebene nachweisbar sind. Diese Analysen wurden exemplarisch mit HPV 16 durchgeführt, da für kutane HPV-Typen keine Antikörper zur Verfügung standen. Mit immunzyto- und histochemischen Methoden (Cytospins oder in Paraffin eingebettete, infizierte HPK, organotypische Hautmodelle) wurde keine spezifische Proteinexpression von HPV 16 E6 oder HPV 16 E7 nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Da davon ausgegangen wurde, dass die Quantität der HPV 16 E6 oder HPV 16 E7 Proteinexpression in retroviral infizierten HPK zu gering ist, um mit diesen Methoden nachgewiesen zu werden, wurden zusätzlich *Western Blot*-Analysen durchgeführt.

Aus pLXSN-, HPV 16 E6- oder HPV 16 E7-infizierten HPK wurden direkt nach dem Abschluß der Selektion Gesamtzellextrakte hergestellt. Für HPV 16 E6 war mit 50 µg oder 100 µg eingesetzter Proteinmenge eine starke Bande in der erwarteten Größe zu sehen (Abbildung 3.2 A) für HPV 16 E7 sah man mit 100 µg Protein eine schwächere Bande in der angenommenen Höhe (Abbildung 3.2 B). Obwohl monoklonale Antikörper verwendet wurden, traten in beiden Fällen zusätzlich unspezifische Banden auf. Die exemplarisch mit HPV 16 durchgeführte *Western Blot*-Analyse zeigte, dass E6 oder E7 in retroviral infizierten HPK auf Proteinebene spezifisch nachweisbar sind.

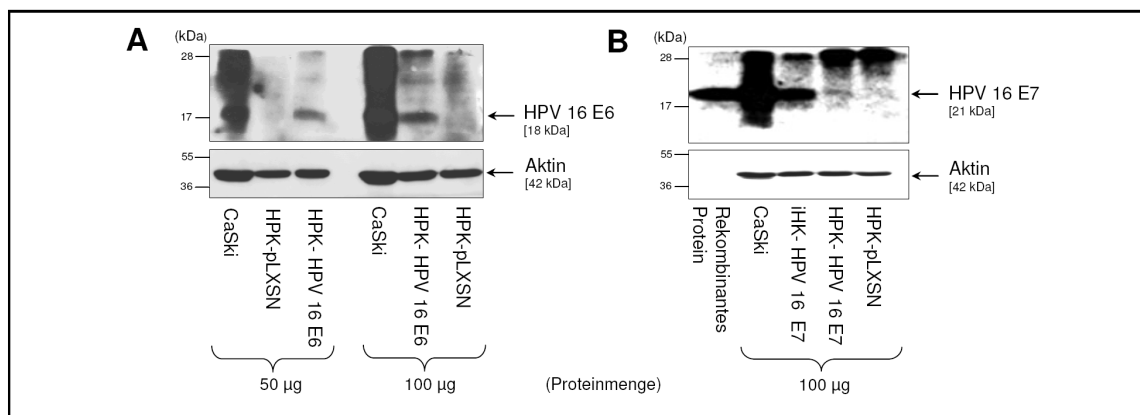


Abbildung 3.2: Proteinnachweis von E6 oder E7 in retroviral infizierten HPK mittels Western Blot Analyse.

(A) HPK-HPV16 E6 und (B) HPK-HPV16 E7 wurden mit 1% SDS Puffer lysiert. 50 bzw. 100 µg Gesamtzellextrakte (Rekombinantes Protein, 30 pg) wurden durch SDS-PAGE getrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern gegen HPV 16 E6, HPV 16 E7 oder Aktin (Ladekontrolle) inkubiert. CaSki Zellen, iHK-HPV 16 E7 oder rekombinantes HPV 16 E7-Protein dienen als Positivkontrolle, HPK-pLXSN als Negativkontrolle. iHK, immortalisierte humane Vorhautkeratinozyten; kDa, Kilodalton.

3.2 Funktionelle Untersuchungen mit HPV E6 oder E7 infizierten HPK (undifferenziert)

3.2.1 Die Expression von E6 oder E7 verlängert die Lebensspanne in HPK

Es ist bekannt, dass die gemeinsame Expression von E6 und E7 mukosaler HR HPV-Typen oder von E7 allein eine Immortalisierung in humanen Vorhautkeratinozyten induzieren kann. In nachfolgenden Untersuchungen sollte analysiert werden, ob HPK unter dem Einfluß der E6 oder E7-Proteine kutaner HPV ebenfalls durch Langzeitkultivierung *in vitro* immortalisiert werden können. Infizierte HPK wurden in einem Dreieransatz kultiviert, bei Subkonfluenz gezählt und definiert erneut ausgesät. Um das Stadium der Zelllinien zu beschreiben wurden Populationsverdopplungen (PD, *Population Doublings*) bestimmt und graphisch dargestellt. Der Tag 0 bezeichnet dabei den Zeitpunkt der Aussaat der HPK. In allen mit E6 infizierten HPK wurde eine erhöhte Poliferation festgestellt (Abbildung 3.3). Außerdem verlängerte sich die Lebensspanne der Zellen, mit Ausnahme von HPV 38 E6 infizierten HPK. Die Zellen der Negativkontrolle stellten ihr Wachstum nach 24 Tagen ein. Sie hatten sich in diesem Zeitraum zweimal verdoppelt. Nach 27 Tagen wurden beispielsweise folgende PD der infizierten HPK erreicht:

HPV 16 E6 und HPV 5 E6	jeweils 6 PD
HPV 4 E6 und HPV 8 E6	jeweils 5 PD
HPV 20 E6 und HPV 38 E6	jeweils 4 PD
HPV 1 E6	3 PD.

Nach diesem Zeitpunkt proliferierten ausschließlich mit HPV 5 E6 (final 6 PD nach 28 Tagen), HPV 8 E6 (final 7 PD nach 30 Tagen) oder HPV 16 E6 (Positivkontrolle, final 7 PD nach 32 Tagen) infizierte HPK weiter, bevor sie ebenfalls ihr Wachstum einstellten. Sie erreichten das Stadium der Seneszenz, in welchem keine weiteren Zellteilungen mehr erfolgen. Das Zellstadium der „Krise“ konnte von E6 infizierten HPK nicht überwunden werden und es wurde keine Immortalisierung erreicht. Nach 27 Tagen hatten sich die infizierten HPK bis zu 6 mal verdoppelt und stellten dann die Proliferation ein.

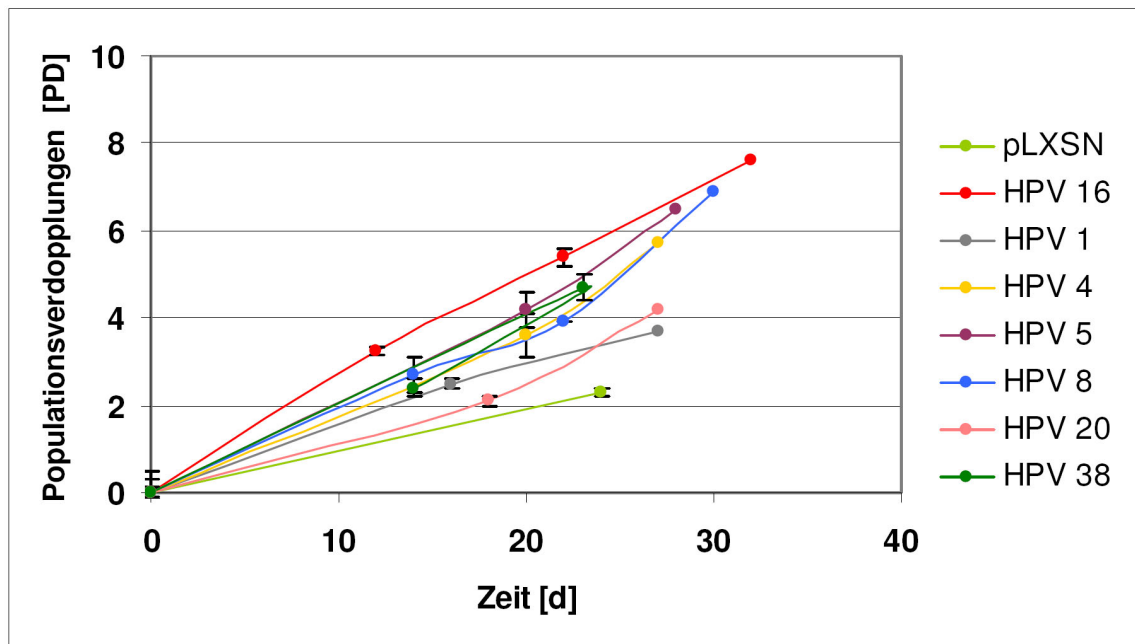


Abbildung 3.3: E6 verlängert die Lebensspanne von HPK.

Dargestellt sind Populationsverdopplungen (PD) von HPV E6 infizierten HPK in einem Zeitraum von 32 Tagen. Mit allen HPV E6 infizierten HPK wurden erhöhte PD ermittelt. Nach der jeweils letzten Passage stellten die Zellen das Wachstum ein und starben ab. PD sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. (RTRX7 E6 wurde nicht verwendet)

In mit E7 infizierten HPK wurde mit HPV 1, HPV 5 und HPV 8 eine Verlängerung der Lebensspanne festgestellt (Abbildung 3.4). Hier wurden nach 28 Tagen folgende PD ermittelt:

HPV 1 E7	7 PD
HPV 5 E7	3 PD
HPV 8 E7	1 PD.

HPK, die mit RTRX7 E7 infiziert waren, stellten nach 12 Tagen und 2 PD ihr Wachstum ein. Mit HPV 5 E7 infizierte HPK und die Positivkontrolle erreichten final 5 PD (nach 55 Tagen) oder 9 PD (nach 34 Tagen). Von HPV 4 E7, HPV 20 E7 oder HPV 38 E7 infizierten HPK war keine Berechnung der PD möglich, da diese Zellen kaum proliferierten und dementsprechend nicht passagiert werden konnten. Auch mit HPV E7 infizierten HPK konnte die Zellkrise nicht überwunden werden. Alle E7-Zelllinien starben ab, eine Immortalisierung der HPK wurde nicht erreicht.

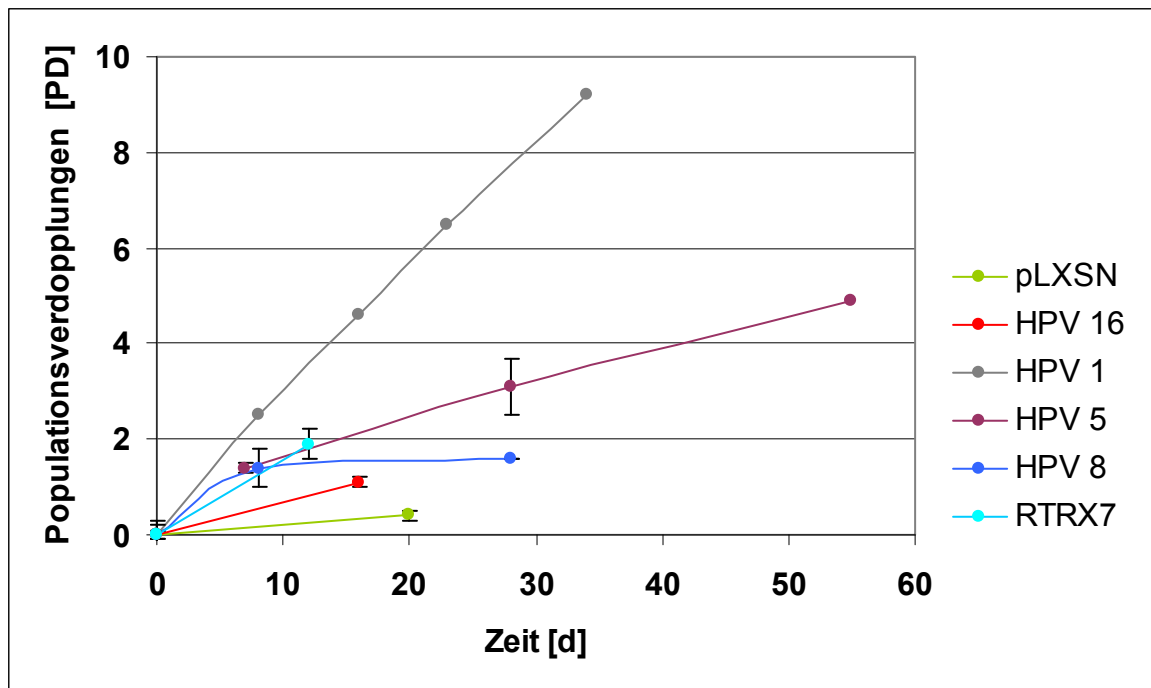


Abbildung 3.4: E7 verlängert die Lebensspanne in HPK.

Dargestellt sind Populationsverdopplungen (PD) von HPV E7 infizierten HPK in einem Zeitraum von 55 Tagen. Mit allen HPV E7 infizierten HPK wurden erhöhte PD ermittelt. Nach der jeweils letzten Passage stellten die Zellen das Wachstum ein und starben ab. PD sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression kutaner E6 oder E7 eine stark erhöhte Proliferation in HPK in unterschiedlichem Ausmaß induzierte. So teilten sich mit HPV 8 E6 infizierte HPK 3,5 Mal häufiger als die Zellen der Negativkontrolle, mit HPV 1 E7 infizierte HPK dagegen 22,5 Mal häufiger. Die Lebensspanne von HPK verlängerte sich in allen hier dargestellten mit HPV E6 oder HPV E7 infizierten Zelllinien. Mit HPV 8 E6 infizierte HPK proliferierten 6 Tage länger, mit HPV 5 E7 infizierte HPK sogar 35 Tage länger als die Negativkontrolle.

3.2.2 Mit HPV 8 E6 infizierte HPK exprimieren hTERT

In Abschnitt 3.2.1 wurde eine Verlängerung der Lebensspanne jedoch keine Immortalisierung in HPV E6 oder E7 infizierten HPK gezeigt. Es ist bekannt, dass HPV 16 E6 die Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase, hTERT, in humanen Vorhautkeratinozyten induziert und damit eine Immortalisierung initiieren kann. Um zu ermitteln, ob in den hier verwendeten Zelllinien eine Telomerasaktivierung erfolgte, wurde in dem folgenden Versuch die hTERT-Expression mittels RT-PCR untersucht. RNA wurde aus infizierten HPK extrahiert, in cDNA umgeschrieben und eine sequenzspezifische PCR-Analyse durchgeführt (Abschnitt 2.2.11). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.5 dargestellt.

hTERT wird, wie erwartet, in HPV 16 E6 infizierten HPK exprimiert. Es war eine starke Bande für das 146 bp Fragment von hTERT zu erkennen. Interessanterweise wurde hTERT ebenfalls in HPV 8 E6 infizierten HPK exprimiert, allerdings in einem schwächeren Ausmaß. In mit HPV E7 infizierten HPK wurde allerdings keine hTERT-Expression nachgewiesen.

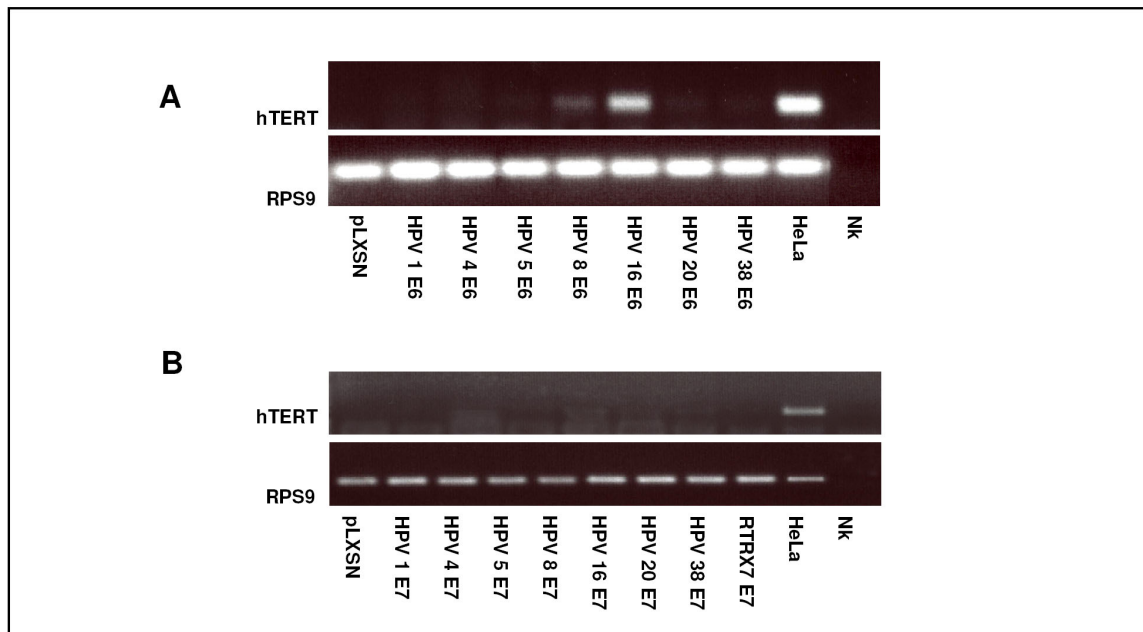


Abbildung 3.5: Expression von hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) in HPV 8 E6 infizierten HPK.

hTERT-Expressionsuntersuchungen in (A) HPV E6 (RTRX7 E6 wurde nicht verwendet) oder (B) HPV E7 infizierten HPK wurde mittels RT-PCR durchgeführt. RPS9 wurde als Normalisierungskontrolle eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,5% Agarosegel separiert. Positivkontrolle: HeLa, Nk., Negativkontrolle (ddH₂O). Mit HPV 8 E6 und HPV 16 E6 ist eine spezifische 146 bp Bande für hTERT zu erkennen.

3.2.3 Mit E6 oder E7 infizierte HPK sind nicht invasiv

Ein entscheidendes Merkmal transformierter maligner Zellen ist ihre Fähigkeit zu invasivem Wachstum. In dem folgenden Versuch wurde analysiert, ob die Expression kutaner HPV E6 oder E7 in HPK einen invasiven Phänotyp induzieren kann. Es wurde ein *in vitro* Invasionssystem mit Matrigel verwendet, in dem SCL-II-Zellen als Positivkontrolle und NIH/3T3-Zellen als Negativkontrolle dienten (Abschnitt 2.3.8). Nach 24 Stunden wurde keine erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zu NIH/3T3-Zellen gemessen (Abbildung 3.6).

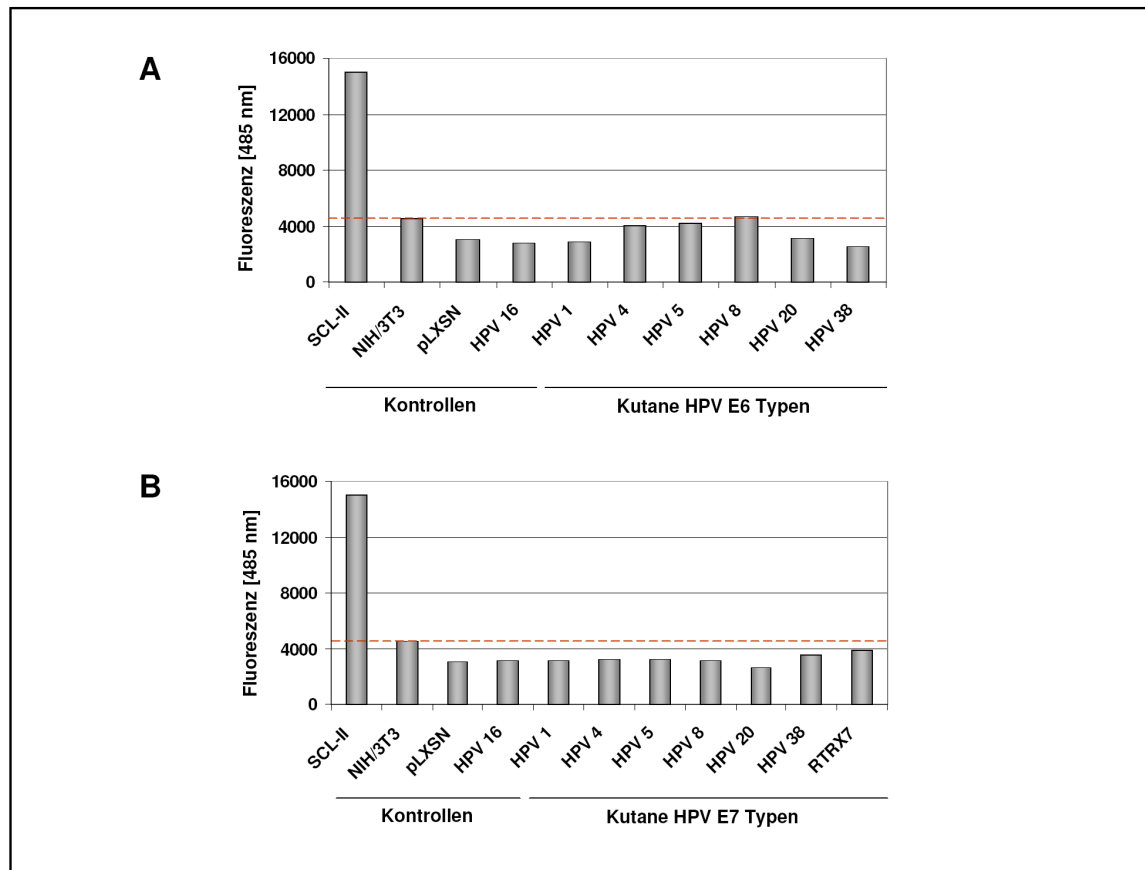


Abbildung 3.6: Keine Invasion mit HPV E6 oder E7 infizierten HPK im Matrigel-Invasionstest.

Mit (A) HPV E6 (RTRX7 E6 wurde nicht verwendet) oder (B) HPV E7 infizierte HPK wurden auf Matrigel ausgesät und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h erfolgten die Färbung mit Calcein-AM und die anschließende photometrische Messung gewandelter Zellen. SCL-II, Positivkontrolle und NIH/3T3, Negativkontrolle. Die rote Linie zeigt jeweils die Werte der Negativkontrolle an. Es wurde keine Invasion festgestellt.

Mit E6 infizierten HPK wurde keine Zellinvasion gemessen, die Werte für HPV 8 E6 waren jedoch im Vergleich zu NIH/3T3 minimal erhöht. Auch mit E7 infizierte HPK wuchsen *in vitro* nicht invasiv. Letztere Ergebnisse bestätigen zusätzlich, dass mit denselben HPV E7 infizierte HPK auch in einem sogenannten „Soft Agar Assay“ kein Invasionsverhalten zeigten (Daten nicht gezeigt). Es wurde also keine Invasion in HPV E6 oder E7 infizierten HPK festgestellt.

3.2.4 Bak wird nach UV-B-Bestrahlung in E6 infizierten HPK nicht degradiert

HR HPV E6 binden nach UV-B Bestrahlung an das Bak-Protein und induzieren dessen Degradation in Keratinozyten. Im folgenden Versuchen wurde analysiert, ob verschiedene kutane HPV E6 nach UV-B Bestrahlung ebenfalls eine Bak-Degradation in HPK bewirken. Infizierte HPK wurden in subkonfluentem Zustand mit einer Einzeldosis von 25 mJ/cm^2 UV-B Strahlung exponiert. Die Zellen wurden nach 24 h, bzw. alle 8 h über einen Gesamtzeitraum von 40 h geerntet und *Western Blot*-Analysen durchgeführt.

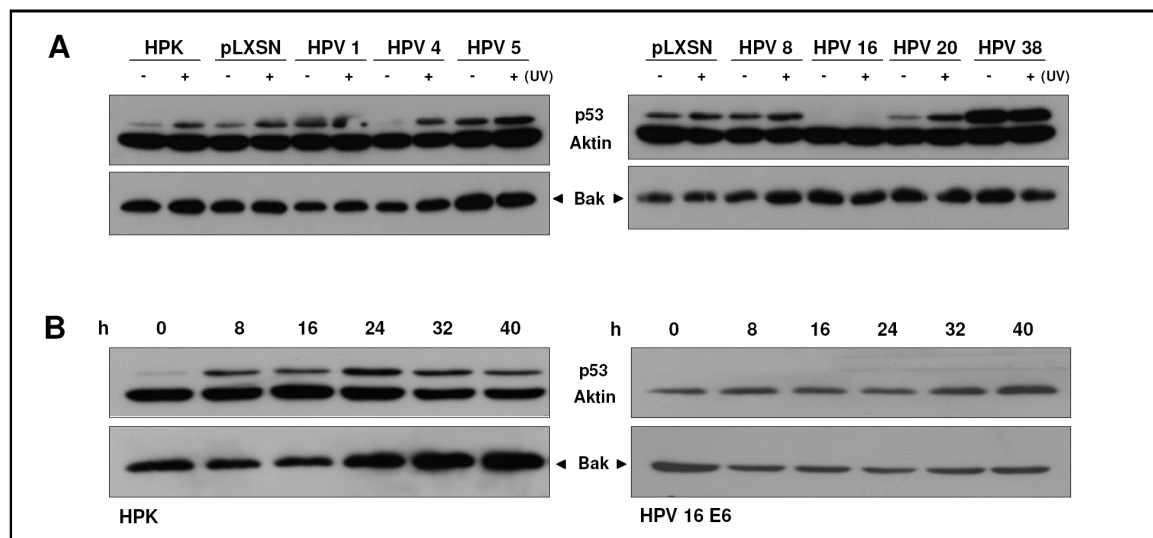


Abbildung 3.7: Bak Expression in E6 infizierten HPK nach 25 mJ/cm^2 UV-B Bestrahlung.

(A) 24 Stunden nach der Bestrahlung (ohne UV,-; mit UV,+) oder (B) über 40 h alle 8 h (hier sind exemplarisch HPK und HPV 16 E6 gezeigt), wurden die Zellen in 1 % SDS-Puffer lysiert. 30 μg Gesamtzellextrakt wurde mittels SDS-PAGE getrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit den entsprechenden Antikörpern, Bak, p53 oder Aktin inkubiert. Es wurden 30 μg Gesamtproteinlysate eingesetzt. Die Bak-Expression war 24 h nach 25 mJ/cm^2 UV-B-Exposition in E6-infizierten HPK nicht verändert.

Die Expression von Bak war nach UV-B-Bestrahlung in den mit E6 infizierten HPK nicht verändert (Abbildung 3.7 A). In nicht-infizierten HPK ist ein leichter Anstieg der Bak-Menge nach 24 h zu sehen. Dieser Effekt wird über 40 h durch eine Zunahme der Bak-Expression deutlicher (Abbildung 3.7 B). Mit HPV 16 E6 war keine Degradation des Bak-Proteins zu sehen. In HPK und allen E6-infizierten HPK-Zelllinien, mit Ausnahme von HPV 16, wurde nach UV-B-Bestrahlung eine verstärkte Expression des Tumorsuppressorproteins p53 induziert. Dies ist die natürliche Antwort der Zelle auf intensive UV-B-Strahlung. In HPV 16 E6 infizierten HPK ist p53 durch die Bindung von E6 vollständig degradiert und wird auch nach UV-B-Bestrahlung nicht induziert.

3.3 Organotypische Hautkulturen

3.3.1 Etablierung organotypischer Hautkulturen mit E7 infizierten HPK

Der Replikationszyklus von HPV ist eng an den Differenzierungsgrad von Keratinozyten gekoppelt. In organotypischen Hautmodellen wird im Gegensatz zu einschichtig wachsenden Zellkulturen eine komplette Differenzierung der Keratinozyten erreicht. Ziel der folgenden Experimente war es, mit E6 oder E7 infizierte HPK in organotypischen Hautkulturen einzusetzen, um den Einfluss der viralen Proteine auf Histologie, Differenzierung, Proliferation, den Zellzyklus und das Invasionspotential der HPK in einem *in vivo*-System zu studieren. Für die Etablierung der organotypischen Hautkulturen wurden mit E6 oder E7 infizierte HPK auf einer Dermis ausgesät und an der Luft-Medium-Grenze kultiviert, um eine Differenzierung der HPK zu induzieren (Abbildung 3.8).

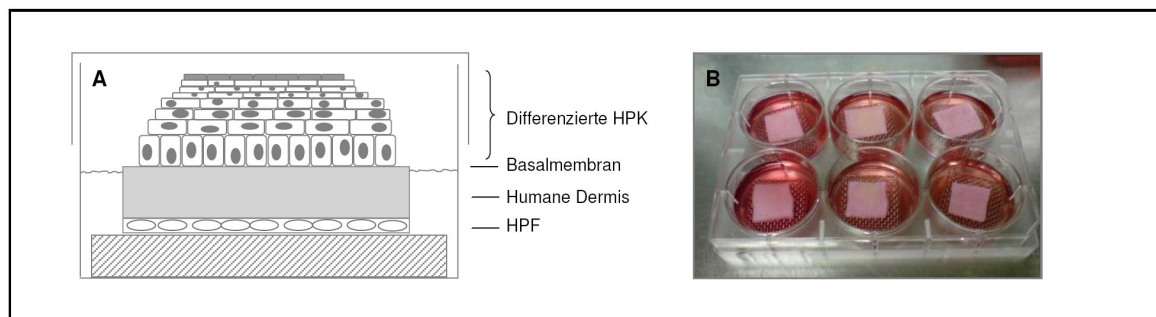


Abbildung 3.8: Darstellung des organotypischen Hautmodells.

(A) Schematischer Aufbau. HPK werden auf die retikuläre (untere) Dermisseite aufgebracht, 24 h später werden (infizierte) HPK auf die papilläre (obere) Dermis ausgesät. Durch Kultur der HPK an der Luft-Medium-Grenze wird ihre Differenzierung induziert. (B) Organotypische Hautmodelle in einer 6-Well-Platte am Kulturtag 8.

Als Positivkontrolle wurde HPV 16, als Negativkontrolle der Leervektor pLXSN verwendet. Da mit HPV E6-Hautkulturen in zwei unabhängigen Experimenten keine Differenzierung der HPK erreicht wurde, wird im Folgenden ausschließlich auf die Ergebnisse der HPV E7-Hautkulturen eingegangen.

3.3.2 Die Histologie ist in E7-Hautkulturen verändert

Präkanzerosen und SCC sind histologisch durch atypische Keratinozyten und verschiedene Zell- und Gewebeotypen gekennzeichnet. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Expression kutaner HPV E7 in differenzierten HPK Zellveränderungen induziert. Für eine histologische Analyse wurden Paraffinschnitte verschiedener HPV E7-Hautkulturen mit HE gefärbt und mit Normalhaut (NH, Lokalisation: Handrücken eines 75 jährigen Patienten) verglichen. Die histologische Beurteilung erfolgte durch einen Pathologen (Oberarzt Dr. H.J. Röwert-Hubert, Charité Universitätsmedizin Berlin, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie).

In NH und in allen Hautkulturen war ein typisches differenziertes Epithel beginnend von *Stratum basale* über *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* bis zum *Stratum corneum* zu erkennen (Abbildung 3.9). Die Histologie der Negativkontrolle (ähnlich zu NH) war weitestgehend unauffällig. Die Expression der kutanen HPV E7 induzierte hingegen verschiedene histologische Veränderungen im Epithel, wie eine allgemeine Hyperkeratose, die am stärksten mit HPV 4 E7 ausgeprägt war. Hautkulturen, welche mit HPV 16 E7 oder HPV 1 E7 infiziert waren, wiesen eine deutliche Fehlorganisation des Keratinozytenverbandes auf, was sich durch dyskaratotische Keratinozyten im *Stratum granulosum* zeigte (Pfeile). In der HPV 5-Hautkultur war ebenfalls eine Differenzierungsstörung der HPK zu beobachten. Hier waren suprabasal größere Zellkerne als im *Stratum basale* zu erkennen. Außerdem fanden sich in diesen Hautkulturen die am stärksten ausgeprägten Reteleisten. In HPV 8 Hautkulturen zeigte sich Akantholyse, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sich Keratinozyten aus dem Zellverband des *Stratum spinosum* ablösen und abkugeln. In der HPV 38 Hautkultur war eine Parakeratose zu erkennen, bei dieser Atypie finden sich Zellkerne im *Stratum corneum* (Pfeile).

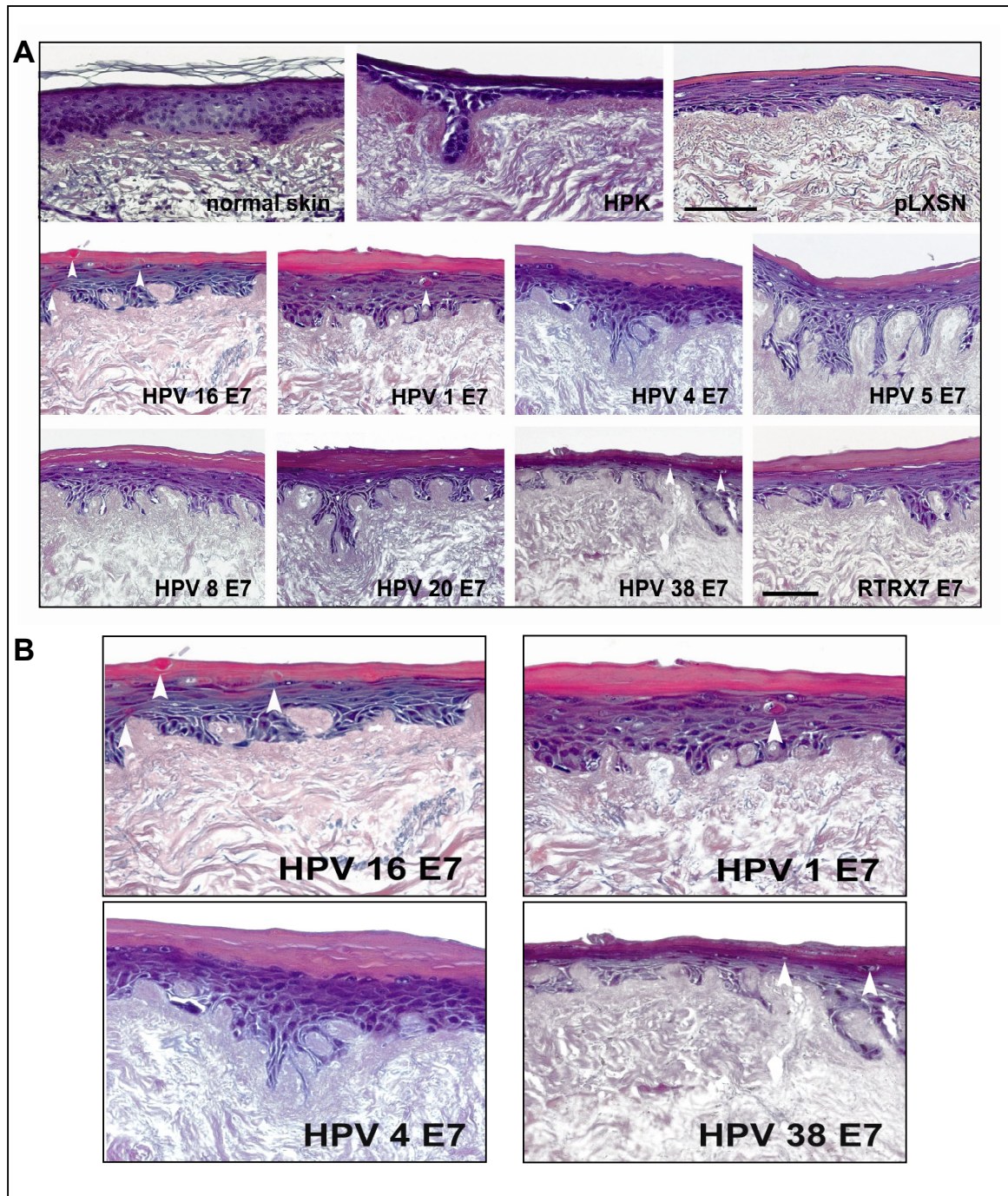


Abbildung 3.9: Die Histologie ist in HPV E7 Hautkulturen verändert.

Infizierte HPK wurden in organotypischer Hautkultur kultiviert. Paraffinschnitte wurden mit HE gefärbt. (A) Eine typische Differenzierung der Epidermis zu erkennen. Dysplastische Veränderungen der HPK sind u.a. in der Positivkontrolle HPV 16, HPV 1 und HPV 38 zu sehen (Pfeile). (B) Vergrößerte Darstellung von Hautkulturen, in denen histologische Veränderungen gefunden wurden. Vergrößerung x200. Maßstabsbalken 100 µm; normal skin, Normalhaut.

3.3.3 Die Differenzierung ist mit HPV 1 E7, HPV 4 E7 und HPV 38 E7 verändert

Differenzierte Epithelien können anhand ihres spezifischen Zytokeratinmusters charakterisiert werden. Veränderungen in diesem Muster weisen auf eine gestörte Differenzierung und damit auf Zellatypien hin. Um den Einfluss des kutanen E7 Proteins auf die Differenzierung infizierter HPK in Hautkulturen zu untersuchen, wurde die Expression verschiedener Zytokeratine (CK) analysiert. In den folgenden Untersuchungen wurde der Nachweis von CK14 als Marker für basale HPK und CK10 für den frühen Differenzierungsgrad suprabasaler Zellschichten verwendet. Das Protein Involucrin, Bestandteil des sogenannten „*cornified envelope*“, gilt als Marker für die terminale Differenzierung. Die Ergebnisse der Differenzierungsuntersuchungen sind in Abbildung 3.10 zu sehen. Exemplarisch sind Positiv- und Negativkontrolle sowie Hautkulturen dargestellt, in denen Veränderungen im Differenzierungsmuster dokumentiert wurden.

Das Expressionsmuster von CK14 war in keiner E7-Hautkultur verändert. Basale sowie suprabasale HPK des *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* wiesen eine homogene zytoplasmatische Färbung mit CK14 auf. Im Gegensatz dazu war die frühe sowie die terminale Differenzierung in HPV 38 E7 bzw. HPV 1 E7 und 4 E7 Hautkulturen verändert. In allen anderen Hautkulturen zeigten sich ähnliche Expressionmuster wie in der Negativkontrolle. Mit HPV 38 war eine deutlich reduzierte zytoplasmatische CK10-Expression im *Stratum granulosum* und –*corneum* zu erkennen. Das Zytokeratin war hier in geringeren Mengen vorhanden und außerdem verstärkt in einzelnen subbasalen HPK konzentriert (Pfeil). Involucrin hingegen war mit HPV 1 und HPV 4 deutlich reduziert exprimiert, im *Stratum corneum* bis auf terminale Bereiche zudem vollständig abwesend (Pfeile).

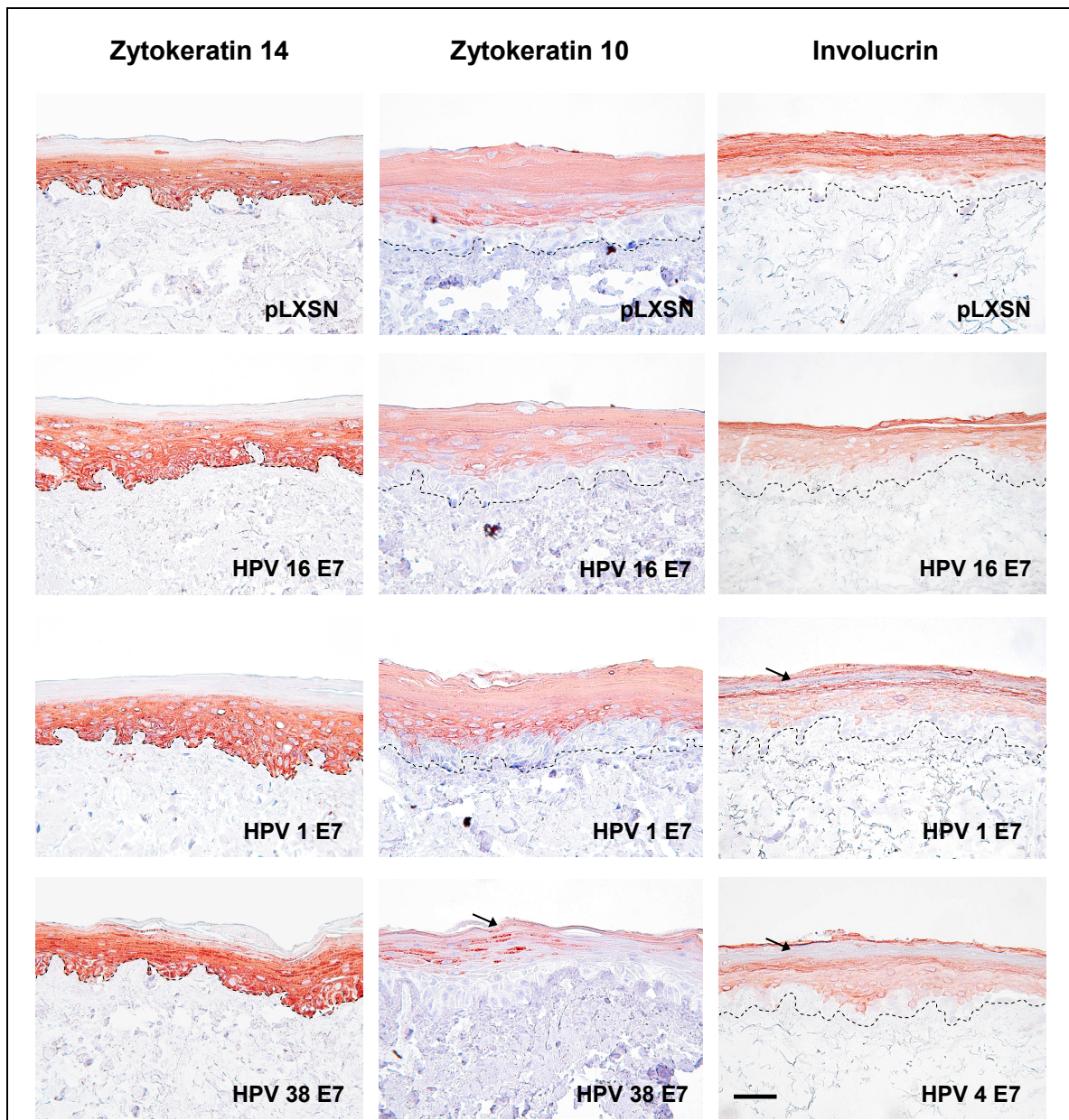


Abbildung 3.10: Veränderte Differenzierung in HPV E7 Hautkulturen.

Mit E7 infizierte HPK wurden in organotypischer Hautkultur kultiviert. Paraffinschnitte wurden mit Antikörpern gegen Zytokeratin 14 (CK14), Zytokeratin 10 (CK10) oder Involucrin gefärbt. Es ist exemplarisch Positivkontrolle und Negativkontrolle sowie veränderte E7-Hautkulturen dargestellt. Die Basalmembran ist markiert. Die basale Expression von CK14 war in keiner E7-Hautkulturen verändert. Im Gegensatz dazu war die frühe (CK10) sowie die terminale Differenzierung (Involucrin) in HPV 38 bzw. HPV 1 und 4 E7-Hautkulturen gestört. Vergrößerung x200. Maßstabsbalken 100 µm.

3.3.4 Die Proliferation der HPK ist in E7-Hautkulturen erhöht

Das E7 Protein induziert durch seine Interaktion mit verschiedenen Zellzyklusproteinen einen starken Wachstumsstimulus. Um den Einfluss kutaner E7 Proteine auf die Proliferation von HPK im Epithel zu analysieren wurden verschiedene Proliferationsmarker untersucht. Die E7 Hautkulturen wurden vor ihrer Fixierung mit BrdU kultiviert. Proliferierende Zellen bauen das Thymidinanalogon in der S-Phase des Zellzyklus in ihre DNA ein. Ki67, ein weiterer Proliferationsmarker, wird während des Zellzyklus in proliferierenden Zellen exprimiert. Die Gewebeschnitte der Hautkulturen wurden mit den Antikörpern gegen Ki67 und anti-BrdU gefärbt und dokumentiert. Zusätzlich wurden positive HPK, über eine Gewebefläche von 1 cm, mikroskopisch ausgezählt. Der Mittelwert aus jeweils vier unabhängigen Untersuchungen wurde graphisch dargestellt.

In den Hautkulturen sind BrdU-positive Keratinozyten (nukleäre Färbung) in basalen und suprabasalen *Strata* zu sehen (Abbildung 3.11 A). Ki67 wurde in den verschiedenen E7-Hautkulturen unterschiedlich stark in basalen HPK exprimiert (nukleäre Färbung). Zusätzlich fanden sich mit HPV 1 E7, 4 E7 und 38 E7 - sowie in der Positivkontrolle, Ki67-positive HPK im suprabasalen Epithel. Die E7-Hautkulturen zeichneten sich allgemein durch eine erhöhte Proliferationsrate aus. Färbungen mit BrdU oder Ki67 zeigten vergleichbare Veränderungen. Die höchsten Proliferationsraten wurden in der Positivkontrolle sowie in E7-Hautkulturen mit HPV 1, 4 und 38 dokumentiert, gefolgt von HPV 5, 8 und 20 (Abbildung 3.11 B). Die Negativkontrollen (HPK und pLXSN) und RTRX7 zeigten keine erhöhte Proliferation.

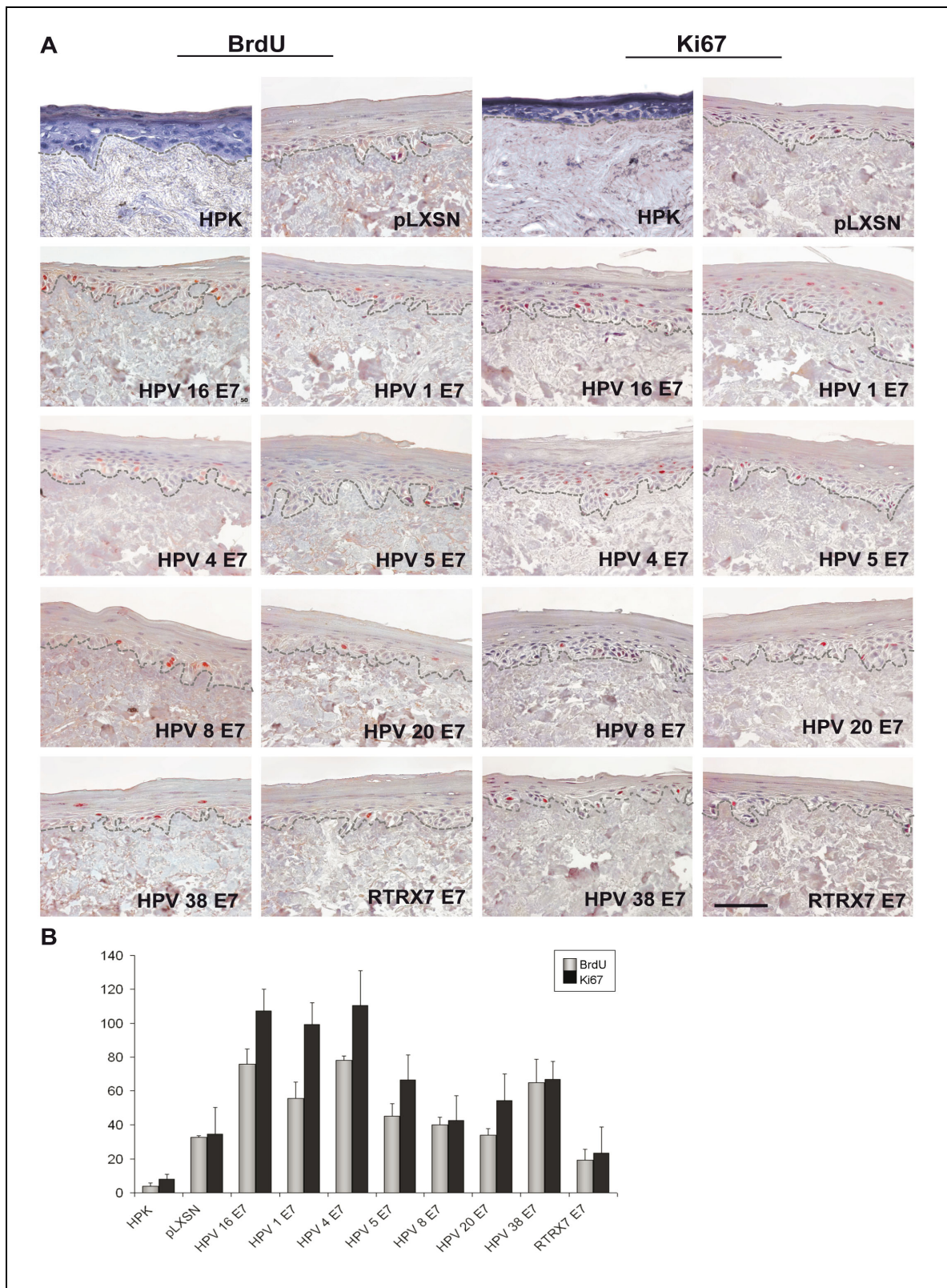


Abbildung 3.11: Proliferation in E7-Hautkulturen.

(A) HPK infiziert mit kutanen HPV E7, wurden in organotypischer Hautkultur kultiviert. Paraffinschnitte wurden mit Antikörpern gegen BrdU oder Ki67 gefärbt. Die Basalmembran ist markiert. Vergrößerung x200. Maßstabsbalken 100 μ m. (B) Die Anzahl BrdU oder Ki67 positiver HPK in 1 cm Hautkultur sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die HPK-Proliferation ist in E7-Hautkulturen erhöht, am stärksten mit HPV 1, 4 und 38 E7.

3.3.5 Der Zellzyklus ist mit HPV 5 E7 oder HPV 8 E7 verändert

Der Zellzyklus ist von fundamentaler Bedeutung in der Karzinogenese, da Störungen in einem ungebremsten Zellwachstum resultieren können. Um den Einfluss des kutanen E7 Proteins auf den Zellzyklus von HPK zu analysieren, wurden Schnitte der Hautkulturen immunhistochemisch mit Fluoreszenzantikörpern gegen p16^{INK4a} und Cyclin E gefärbt und mikroskopisch dokumentiert (Abbildung 3.12, dargestellt sind exemplarisch Hautkulturen in denen Effekte beobachtet wurden).

Keratinocyten, welche positiv für p16^{INK4a} oder Cyclin E sind, fanden sich sowohl im basalen als auch im subbasalen Epithel der Hautkulturen. In HPV 5 E7, HPV 8 E7-Hautkulturen und in der Positivkontrolle sah man eine allgemein verstärkte nukleäre Cylin E-Expression. Cyclin E wird in Zellen beim Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus vermehrt exprimiert. p16^{INK4a} wird nukleär und auch zytoplasmatisch exprimiert. Auch hier war eine höhere Expression in HPV 5 E7, HPV 8 E7- Hautkulturen als auch in der Positivkontrolle zu erkennen. Einzelne HPK, welche positiv für sowohl p16^{INK4a} als auch für Cyclin E waren, wurden in subbasalen *Strata* von HPV 5-, 8- und 16 E7-Hautkulturen gefunden (Pfeile, Abbildung 3.12). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression von HPV 5 E7 oder HPV 8 E7 in suprabasalen HPK durch die bereits gezeigte erhöhte Proliferation (Abschnitt 3.3.4) einen Eintritt der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus fördert.

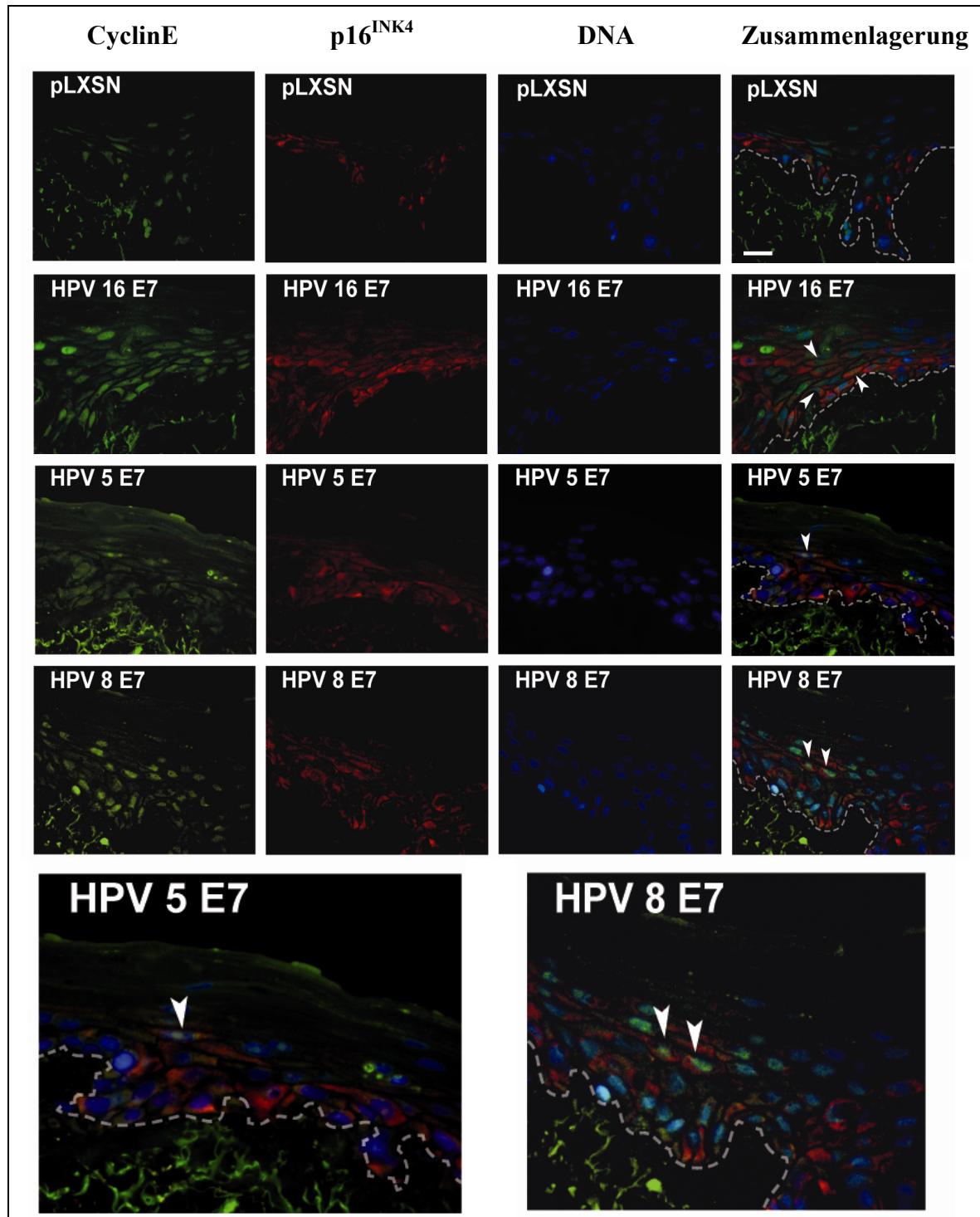


Abbildung 3.12: Suprabasale Ko-Lokalisation von Cyclin E und p16^{INK4a} in HPV 5 E7, 8 E7 und 16 E7 Hautkulturen.

HPK infiziert mit HPV E7 wurden in organotypischer Hautkultur kultiviert. Paraffinschnitte wurden mit Fluoreszenzantikörpern gegen Cyclin E (grün) und p16^{INK4a} (rot) gefärbt. Gegenfärbung der DNA mit Dapi (blau). Es sind exemplarisch Positivkontrolle und Negativkontrolle sowie ausgewählte E7-Hautkulturen dargestellt. Einzelne doppelt angefärbte HPK im suprabasalen Epithel von HPV 5, 8 und 16 E7-Hautkulturen sind mit Pfeilen markiert. Vergrößerung x400. Maßstabsbalken 100 µm.

3.3.6 Die Expression von Tenascin-C ist erhöht mit HPV 4 E7, HPV 8 E7, HPV 38 E7 und RTRX7 E7

Die Fähigkeit zu invasivem Wachstum wurde bereits mit E6 oder E7 infizierten HPK untersucht. Hier konnte mit dem Matrigel-Invasionstest kein invasives Potential der verschiedenen E7 HPK-Zelllinien festgestellt werden (Abschnitt 3.2.3). Ziel der folgenden Experimente war es, Veränderungen in der Expression von Tenascin-C (TN-C) und somit des Invasionspotentials E7 infizierter HPK in differenzierten, organotypischen Hautkulturen zu untersuchen. TN-C ist ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix (ECM), welches als schmaler Streifen im *Stratum papillare* (Oberseite der Dermis) exprimiert wird. Im Prozess der Tumorgenese wird TN-C in verschiedenen Geweben verstärkt exprimiert. Von unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich gezeigt werden, dass TN-C in der Hautkarzinogenese, von NH über AK bis zu SCC sequenziell verstärkt exprimiert wird. Die TN-C-Expression war in den hier untersuchten E7-Hautmodellen unterschiedlich stark. TN-C war in E7-Hautkulturen von HPV 4, 8, 38 und RTRX7 in der ECM, nahezu über das gesamte *Stratum papillare*, deutlich stärker exprimiert (Abbildung 3.13).

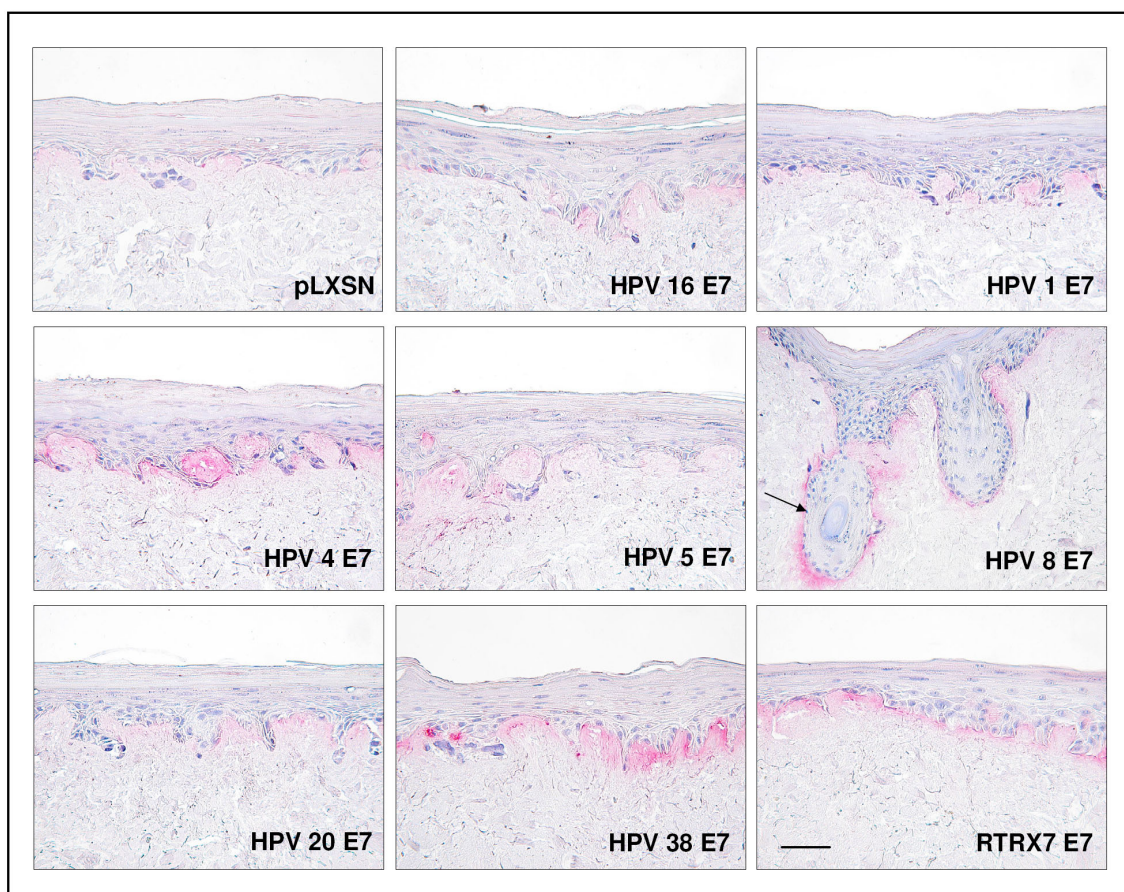


Abbildung 3.13: Tenascin-C-Expression in E7-Hautkulturen.

HPK infiziert mit HPV E7 wurden in organotypischer Hautkultur kultiviert. Paraffinschnitte wurden mit einem Antikörper gegen Tenascin-C (TN-C) gefärbt. Vergrößerung x200. Maßstabsbalken 100 µm. Die Expression von TN-C im *Stratum papillare* (Oberseite der Dermis) ist mit HPV 4, 8, 38 und RTRX7 E7-Hautkulturen deutlich erhöht.

Bei HPV 8 E7-Hautkulturen war außerdem ein Vordringen von HPK in die Dermis zu erkennen. Hier wurden sogenannte „Hornperlen“ (Pfeil) gefunden, die von konzentrisch und zwiebelschalenförmig gelagerten, verhornenden Zellen geformt werden. Hornperlen sind diagnostische Merkmale einer gestörten Zelldifferenzierung und wurden bereits für HPV 8 E7- Hautkulturen beschrieben. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in einem organotypischen Hautmodell eine erhöhte TN-C-Expression für HPV 4 E7, 8 E7, 38 E7 und RTRX7 E7 gezeigt wurde, was auf ein invasives Potential dieser HPV-Typen deutet.

3.3.7 Zusammenfassung der beobachteten Effekte in HPV E7-Hautkulturen

In folgender Tabelle sind die bereits beschriebenen Ergebnisse der Untersuchungen zu Histologie, Differenzierung, Proliferation, Zellzyklus sowie der Expression von Tenascin-C dargestellt. Dabei wurde eine Skalierung für die Stärke des beobachteten Effekts von + (schwach) bis +++ (stark) verwendet.

Tabelle 3.2 : Überblick über beobachtete Effekte der verschiedenen Untersuchungen in HPV E7-Hautkulturen. Die Stärke der Veränderungen ist von + bis +++ angegeben. (-, kein Effekt).

HPV E7	Veränderte Histologie	Veränderte Differenzierung	Erhöhte Proliferation	Veränderter Zellzyklus	Expression von TN-C
1 E7	++	++	+++	-	-
4 E7	+	++	+++	-	++
5 E7	++	-	++	++	-
8 E7	++	-	+	++	++
20 E7	+	-	+	-	-
38 E7	++	++	++	-	++
RTRX7	+	-	-	-	++

4 Diskussion

4.1 Untersuchungen von HPV E6 oder E7 infizierten HPK

Zahlreiche epidemiologische Studien belegen eine erhöhte Prävalenz kutaner HPV (beta/gamma-HPV) in Präkanzerosen und SCC der Normalbevölkerung sowie bei immunsupprimierten Organtransplantierten verglichen mit Kontrollen. In vorhergehenden Studien unserer Arbeitsgruppe (Dang et al., 2006b) und von Purdie et al. (2005) wurde gezeigt, dass in AK und SCC zudem eine Expression der Onkogene E6 oder E7 von beta-HPV nachweisbar ist, was für eine aktive Beteiligung der Viren an Zelltransformationsprozessen und der Progression von NMSC sprechen könnte.

Von mukosalen HPV-Typen weiß man, dass eine Infektion mit HR-HPV allein zwar nicht ausreichend ist, aber eine notwendige Voraussetzung für die Entstehung eines malignen Karzinoms der Zervix darstellt. So führt die konstitutive Expression der HPV 16 oder 18 E6/E7-Gene *in vitro* zu einer Immortalisierung primärer Vorhautkeratinozyten (Münger et al., 1989; Schlegel et al., 1988), während eine tumorigene Transformation weitere genetische Veränderungen erfordert. Insbesondere durch die Bindung der viralen Gene E6 und E7 jeweils an die Tumorsuppressorproteine p53 und pRb kommt es zu einer Deregulation des Zellzyklus und zu einer Anhäufung chromosomaler Veränderungen.

Molekulare Mechanismen kutaner HPV-Typen sind noch weitgehend unbekannt. Bislang ist ein zelltransformierendes Potential der Onkogene E6 oder E7 kutaner HPV *in vitro* zumeist in murinen Fibroblasten (Iftner et al., 1988; Schmitt et al., 1994) oder humanen Vorhautkeratinozyten nachgewiesen worden. Es existieren wenige Studien mit humanen primären Keratinozyten (HPK) der Haut, die die Rolle dieser Proteine bei der Hautkarzinogenese untersuchen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Onkogene E6 oder E7 verschiedener kutaner HPV-Typen (beta/gamma) aber auch von HPV 1 (mu-HPV) ein zelltransformierendes Potential *in vitro* in ihren natürlichen Wirtszellen, den HPK der adulten Haut, besitzen. Es wurde eine große Anzahl kutaner beta- und gamma-HPV-Typen (HPV 4, 5, 8, 20, 38, RTRX7), die mit humanen benignen oder malignen Läsionen assoziiert sind, untersucht. In vorangegangenen *in vitro* Studien wurde zudem gezeigt, dass HPV 1 (warzenassoziierter, mu-HPV Typ) zelltransformierende Eigenschaften aufweist (Schmitt et al., 1994). Aus dem Grund wurde dieser HPV-Typ ebenfalls in die Untersuchungen eingeschlossen.

4.1.1 Verlängerte Lebensspanne und h-TERT Expression in E6 oder E7 infizierten HPK

Es ist bekannt, dass primäre somatische Zellen *in vitro* nach wenigen Zellteilungen ein Seneszenzstadium erreichen, in welchem die Proliferation stagniert. Es erfolgen keine weiteren Teilungen, die Zellen sterben langsam ab. Die zelluläre Seneszenz von Keratinozyten kann *in vitro* durch die Expression von E6 und E7 der HR-HPV-Typen umgangen werden, die Zellen werden unbeschränkt teilungsfähig bzw. immortal.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass HPK, die mit kutanen E6 allein infiziert wurden, nicht immortalisiert werden. Interessanterweise zeigten die Zellen jedoch teilweise eine stark verlängerte Lebensspanne. Dies korreliert mit der Literatur zu HR-HPV-Typen. Studien zeigen, dass die Expression von HPV 16 E6 allein die Lebensspanne von Zellen verlängert, jedoch erst ein Zusammenspiel von HPV 16 E6 und E7 eine Immortalisierung in kultivierten Keratinozyten induziert (Kiyono et al., 1998; Münger und Howley, 2002). In Kombination mit weiteren Defekten können in diesen bereits veränderten Keratinozyten Mutationen akkumulieren, die die Progression von Tumoren begünstigen (Plug-DeMaggio et al., 2004). Am deutlichsten war die Verlängerung der Lebensspanne mit HPV 8 E6, HPV 5 E6 und HPV 4 E6 (Abbildung 3.3). Diese Zelllinien verdoppelten sich drei bis viermal häufiger als die Zellen der Negativkontrolle, bevor sie ihr Wachstum einstellten. Auch Bedard et al. (2008) zeigten eine Verlängerung der Lebensspanne durch die Expression kutaner HPV E6, allerdings in retroviral infizierten Vorhautkeratinozyten. Mit HPV 38 E6 infizierte Zellen, gefolgt von HPV 8 E6 und HPV 5 E6 proliferierten am stärksten. Es wurden durchschnittlich höhere PD erreicht, was auf die verwendeten Zellen zurückzuführen sein könnte. Keratinozyten der Vorhaut können *per se* eine höhere Anzahl von PD erreichen, da sie aus juveniler Haut isoliert werden.

Um zu überprüfen, ob in diesem Zusammenhang unter Umständen eine Aktivierung der Telomerase initiiert wurde, folgten Untersuchungen zur Expression von hTERT. Die Aktivierung der Telomerase durch HPV 16 E6 scheint ein wichtiger Schritt in der zellulären Transformation von Keratinozyten während einer viralen Infektion *in vivo* zu sein (Klingelhutz et al., 1996). In dieser Arbeit wurde eine schwache Expression von hTERT nach HPV 8 E6-Infektion gezeigt, die jedoch wie erwartet keine Immortalisierung in den infizierten HPK induzieren konnte. Dieses Ergebnis korreliert interessanterweise mit der Beobachtung, dass mit HPV 8 E6 infizierte HPK die höchsten PD in Zellkultur erreichten. Kürzlich wurde gezeigt, dass auch E6 der kutanen HPV 5, 8, 20 und 38 das Potential besitzen, die Telomerase in Keratinozyten unterschiedlich stark zu aktivieren (Bedard et al., 2008). Auch diese Arbeiten wurden jedoch mit Vorhautkeratinozyten durchgeführt, was die abweichenden Ergebnisse erklären könnte. Außerdem wurde hier zusätzlich die Aktivierung der zellulären Telomerase mit einem sogenannten „TRAP (*telomeric repeat amplification protocol*)-Assay“ nachgewiesen, einer auf PCR-basierender quantitativen Methode zur Bestimmung der

Telomeraseaktivität (Kim et al., 1994). Ob auch HPV 8 E6 in HPK eine Aktivierung der Telomerase induziert, sollte weiterführend untersucht werden.

Auch mit kutanen HPV E7 infizierten HPK wurde eine deutliche Verlängerung der Lebensspanne in Kultur beobachtet, am stärksten mit HPV 1, 5 und 8. HPV 1 wird mit einem benignen Warzentyp assoziiert. Allerdings konnte mit HPV 1 E7 in der Literatur auch gezeigt werden, dass es den Phänotyp stark transformiert (Schmitt et al., 1994). Eine h-TERT-Expression wurde jedoch in keiner mit E7 infizierten HPK-Zelllinie nachgewiesen. Es ist bekannt, dass durch hohe Mengen des E7-Proteins der HR-alpha-PV eine Immortalisierung in Vorhautkeratinozyten induziert wird (Halbert et al., 1991). Unter Umständen war die E7-Proteinmenge in infizierten HPK zu gering, um eine Immortalisierung zu induzieren. Eine weitere Erklärung könnte in der Methode der Kultivierung der infizierten HPK zu finden sein. Fu et al. (2003) zeigten in ihrer Studie mit HPV 16 E6/E7 exprimierenden Vorhautkeratinozyten, dass die Aktivität der Telomerase in serumhaltigem Medium auf feeder-Zellen im Vergleich zu serumfreiem Medium signifikant erh. war. Diese Beobachtung legt nahe, dass eine HPK-Immortalisierung in serumfreiem Medium schwerer zu erreichen ist. Um diese Annahme zu klären, sollten sich Untersuchungen mit kutanen E6 oder E7 exprimierenden HPK in serumhaltigem Medium, auf feeder-Zellen anschließen.

Im Fall von HPV 8 E6 könnte die Expression von h-TERT einen Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen ausüben. Diese Ergebnisse lassen aber generell nicht den Schluss darauf zu, dass die Aktivierung der Telomerase für eine Verlängerung der Lebensspanne infizierter HPK erforderlich ist. Sie deuten allerdings darauf hin, dass die Expression kutaner HPV E6 oder E7 in HPK weitere Mechanismen induziert, die die zelluläre Seneszenz retardieren. Weitere Untersuchungen sind nötig um zu klären, welche Mechanismen für die Verlängerung der Lebensspanne durch kutane HPV E6 oder E7 in HPK verantwortlich sein könnten.

4.1.2 Bak Degradation nach UV-B-Bestrahlung in HPV E6 infizierten HPK

Werden durch UV-B-Strahlung entstandene starke DNA-Schäden in Zellen nicht repariert und keine Apoptose eingeleitet, können sich Mutationen anhäufen, die zur Tumorentstehung führen können. Es ist bekannt, dass Viren in der Lage sind, die Apoptose ihrer Wirtszellen durch verschiedene Mechanismen zu blockieren (Lane und Crawford, 1979; Zantema et al., 1985).

HR-HPV E6 können das Bak-Protein degradieren und verhindern so eine p53-unabhängige Apoptose (Thomas und Banks, 1998). In keiner mit E6-infizierten HPK-Zelllinie konnte nach 24 h durch 25 mJ/cm² UV-B-Strahlung eine Degradation des Bak-Proteins induziert werden. Auch mit HPV 16 E6 wurde keine Veränderung in der Menge von Bak gesehen. Das E6-Protein ist jedoch aktiv, da p53 degradiert ist und auch nach UV-B-

Bestrahlung in den HPK nicht nachzuweisen war. In allen anderen E6-infizierten HPK wird p53 nach der UV-B-Bestrahlung induziert. Es kann also davon ausgegangen werden, dass durch die gewählte UV-B-Dosis eine DNA-Schadensantwort in den HPK induziert wird, in denen Bak, als anti-apoptotisches Protein, ebenfalls eine Rolle spielen könnte.

Nicht-infizierte HPK zeigten über einen Zeitraum von 40 h eine deutliche Akkumulierung des Bak-Proteins. Dies wurde nach der Literaturlage auch erwartet (Jackson et al., 2000). In der Studie von Jackson et al. (2000) wurde allerdings gezeigt, dass auch die Expression von HPV 5 E6 die Degradation von Bak nach 15 mJ/cm² UV-B-Strahlung verursacht. Diese Untersuchungen wurden jedoch mit E6-infizierten HT1080-Zellen durchgeführt. Diese Fibrosarkomzelllinie weist einen Defekt in einem Allel des N-ras-Gens auf (Hall et al., 1983) und stellt überdies nicht die natürlichen Wirtszellen kutaner HPV dar. Es existieren bis jetzt keine Studien, die eine mögliche Degradation von Bak in HPK untersuchen, die mit kutanen E6 infiziert wurden.

Basierend auf diesen ersten Ergebnissen sollten HPK als Zellsystem die Methode der Wahl sein, um das Bak-Protein nach UV-B-Strahlung zu charakterisieren. So kann sich der Frage angenähert werden, ob auch in HPK durch kutane HPV E6 Mechanismen induziert werden, die die Apoptose umgehen können und zur malignen Transformation von Keratinozyten führen könnten.

4.2 Untersuchungen HPV E7 infizierter HPK in organotypischen Hautmodellen

Die Differenzierung von Keratinozyten ist für den viralen Replikationszyklus der HPV *in vivo* entscheidend. Aus diesem Grund wurden im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit differenzierte, mit HPV E6 oder E7 infizierte HPK in einem organotypischen Hautmodell untersucht. Überdies können in einem solchen Modell, im Gegensatz zu einschichtig wachsenden Zellen, komplexe Effekte in einem Epithelverband von HPK beobachtet werden. Die stabile Genexpression von E6 oder E7 wurde durch den viralen 5' LTR-Promotor reguliert, dessen Aktivität unabhängig von der Differenzierung in Vorhautkeratinozyten ist (Boxman et al., 2001; Caldeira et al., 2003; Halbert et al., 1992).

Es gelang im Rahmen dieser Arbeit nicht, die Expression von E7 in HPK immunhistochemisch in Gewebeschnitten der Hautkulturen nachzuweisen. Für weitere Studien könnte dieser Nachweis mittels RNA-*in situ* Hybridisierung erbracht werden. Unter Verwendung organotypischer Hautmodelle, die auf einer Kollagenmatrix basieren, wurden in den letzten Jahren beachtliche Fortschritte in der funktionellen Analyse von HPV gemacht (Chow und Broker, 1997). Boxman et al. (2001) untersuchten beispielsweise das

transformierende Potential der E6/E7-Proteine der beta-HPV 5, 12, 15, 17, 20 oder 38 und des mukosalen HR-HPV 16. Sie konnten zeigen, dass die Expression von HPV E6/E7 zusammen, Proliferation und Differenzierung in Vorhautkeratinozyten verändert.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es nachzuweisen, dass das E7-Protein allein ebenfalls einen sehr deutlichen Einfluss auf die Histologie, die Differenzierung und Proliferation von HPK in organotypischen Hautkulturen besitzt. Interessanterweise wurden außerdem Veränderungen im Zellzyklus, sowie ein mögliches invasives Potential einiger HPV-Typen beobachtet.

4.2.1 Histologie, Proliferation und Differenzierung HPV E7 infizierter HPK in organotypischen Hautmodellen

Merkmale von Zelltransformation und der Bildung von Tumoren sind Zellveränderungen im Gewebe. Wie in Normalhaut wurde in Hautkulturen, die mit dem Leervektor pLXSN infiziert wurden, ein distinktes und differenziertes Epithel ausgebildet. Diese Ergebnisse zeigen, dass die retrovirale Infektion die epitheliale Differenzierung nicht verändert. Die beobachtete, allgemein starke Hyperproliferation des Epithels ist zum einen auf das Hautkultursystem an sich zurückzuführen, da Keratinozyten in organotypischen Hautmodellen stark proliferieren. Zum anderen wird durch die Expression des E7-Protein ein starker Proliferationsstimulus ausgelöst (zur Hausen, 2002). Dysplastische Zellveränderungen fanden sich ausschließlich in suprabasalen Strata der Hautkulturen, was auch durch die homogene Expression von CK 14 bestätigt wurde. Dieser Differenzierungsmarker war nicht verändert, demnach scheint die Expression von E7 die basale Differenzierung von HPK in organotypischen Hautmodellen nicht zu verändern. Interessanterweise induzierte HPV 4 E7 die ausgeprägteste Hyperproliferation und weiterhin eine gestörte Differenzierung in terminalen Strata. Dies korreliert mit dem benignen, hyperproliferativen Phänotyp von HPV 4-assoziierten Warzen *in vivo*. HPV 4 wurde jedoch auch in kutanen SCC (Primärtumore und Rezidive) gefunden (Nindl et al., 2006). Das differenzierte Epithel der HPV 16 E7-Hautkulturen wies Ähnlichkeiten mit invasiven mukosalen Läsionen *in vivo* auf. Diese sind durch eine Fehlorganisation des Zellverbandes und atypische dyskeratotische Keratinozyten in suprabasalen Zellschichten charakterisiert. In der Studien von Boxman et al. (2001) wurde dieser Effekt mit HPV 16 E6/E7 induziert. Interessanterweise zeigten sich ebenfalls in den HPV 1 E7-Hautkulturen, wenn auch weniger häufig, dyskeratotische HPK in suprabasalen Strata. Diese Fehlorganisation äußerte sich weiterhin in einer reduzierten Involucrin-Expression. In *Verruca vulgaris* wird Involucrin in allen suprabasalen Strata exprimiert, in SCC ist das Protein dagegen komplett abwesend oder nur lokal in geringen Mengen vorhanden (Murphy et al., 1984). Eine veränderte Involucrin-Expression fand sich in HPV 1

E7 und HPV 4 E7-Hautkulturen. Hier war das Protein nur in terminalen keratinisierten HPK im *Stratum corneum* vorhanden.

Interessanterweise wurden mit HPV 1 E7 und HPV 4 E7 auch die stärksten Proliferationsraten in den organotypischen Hautkulturen beobachtet. Diese Ergebnisse korrelieren wiederum mit der *in vivo* durch diese warzenassoziierten HPV-Typen induzierte Hyperproliferation. HPV 5 E7 und HPV 8 E7-Hautkulturen wiesen auch Abberationen im Epithelverband der HPK, wie beispielsweise akantholytische Strukturen, auf. Eine weitere histologische Auswirkung gestörter Differenzierung sind die in HPV 8 E7-Kulturen gefundenen Hornperlen. Diese wurden ebenfalls in der Studie von Akgul et al. (2005) für HPV 8 E7 beschrieben. In den Hautkulturen von HPV 38 E7 wurde Parakeratose festgestellt, was in einer sehr stark reduzierten CK 10-Expression im *Stratum granulosum* resultierte. Durch die Expression von HPV 38 E7 scheint also eine starke Störung der Differenzierung in suprabasalen Schichten des Epithels induziert zu werden, was auch in der Studie von Boxman et al. (2001) mit HPV 38 E6/E7 gezeigt wurde. Demnach könnte das E7-Protein der kutanen HPV-Typen unter Umständen allein für die beschriebenen Veränderungen in den differenzierten Hautkulturen verantwortlich sein. Weitere Untersuchungen mit kutanen HPV E6 in organotypischen Hautkulturen sollten sich anschließen, um diese Hypothese zu verifizieren.

Die beschriebenen, teilweise kardinalen Veränderungen der mit E7 infizierten HPK in einem differenzierten Epithel sind charakteristische histologische Merkmale von kutanen Aktinischen Keratosen und SCC.

4.2.2 Übergehen des p16^{INK4a} induzierten Zellzyklusstops in E7 infizierten HPK in organotypischen Hautmodellen

Ein wichtiger Schritt in der Tumorgenese ist die Deregulation des Zellzyklus. Der cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor p16^{INK4a} ist ein Regulator des G1/S-Phase-Kontrollpunktes im Zellzyklus. In Zervixkarzinomen und zervikalen Präkanzerosen, die mit HR HPV infiziert sind, ist p16^{INK4a} durch die Aktivität von E7 stark überexprimiert, allerdings nicht funktionell als Kinaseinhibitor. Aus diesem Grund wird p16^{INK4a} in der Klinik als Früherkennungsmarker eingesetzt (Murphy et al., 2003). Auch in Präkanzerosen und SCC der Haut findet sich eine erhöhte p16^{INK4a}-Expression in einzelnen dysplastischen Keratinozyten (Nindl et al., 2004).

In allen hier untersuchten E7-Hautkulturen war p16^{INK4a} exprimiert. Eine schwächere Expression wurde nur in HPV1 E7 oder HPV 4 E7-Hautkulturen gesehen (Daten nicht gezeigt). Generell scheint also die Expression von E7 in organotypischen Hautkulturen die Expression von p16^{INK4a} zu erhöhen.

Cyclin E ist ein Zellzyklusprotein, das den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus kennzeichnet. In vielen Tumoren ist Cyclin E überexprimiert (Donnellan und Chetty, 1999). In der normalen humanen Epidermis wird Cyclin E nur in wenigen basalen Keratinozyten exprimiert, die sich in der G1/S-Phase des Zellzyklus befinden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in den HPV 5 E7 und HPV 8 E7-Hautkulturen interessanterweise einzelne subbasale HPK positiv für p16^{INK4a} und für Cyclin E waren. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass HPK, die mit HPV 5 E7 oder HPV 8 E7 infiziert sind, den p16^{INK4a} induzierten Zellzyklusstop überwinden und die Keratinozyten unkontrolliert proliferieren können. Dies wurde in Studien von Cheng et al. (1995) mit HPV 18 E7 und von Banerjee et al. (2006) auch für die LR-HPV 6 und 11 in einem organotypischen Hautmodell beschrieben. Allerdings kann nicht vollständig belegt werden, dass sich die für p16^{INK4a} und Cyclin E differenzierten, postmitotischen HPK in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Aus diesem Grund sollten die vorliegenden Ergebnisse beispielsweise mit einer immunhistochemischen Färbung gegen p16^{INK4a} und BrdU, das in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut wird, verifiziert werden.

In dieser Arbeit wurden Hinweise darauf erbracht, dass das E7-Protein der beta-HPV 5 und HPV 8 einen Eintritt der HPK in die S-Phase des Zellzyklus fördert. Durch einen unkontrollierten Eintritt von Keratinozyten in die S-Phase des Zellzyklus und daraus resultierende Akkumulation genetischer Veränderungen könnte eine Initiation benigner oder maligner Läsionen im Epithel induziert werden.

4.2.3 Invasives Potential HPV E7 infizierter HPK in organotypischen Hautmodellen – Tenascin-C als potentieller Marker für Invasion

Ein entscheidendes Merkmal progredierender Tumorzellen ist ihre Fähigkeit zu invasivem Wachstum. In einer Studie von Akgul et al. (2005) wurde unter Verwendung des gleichen organotypischen Hautmodells wie in der vorliegenden Arbeit, ein invasives Potential von infizierten HPK in HPV 8 E7-Hautkulturen beschrieben. Es wurde eine Veränderung der Differenzierung der HPK beobachtet, die mit der Bildung von sogenannten „Hornperlen“ einherging. In der vorliegenden Arbeit wurde, abgesehen von vereinzelt Hornperlen, keine entsprechende Veränderung der Differenzierung mit HPV 8 E7-Hautkulturen wie in der Studie von Akgul et al. (2005) beobachtet. Dies lässt sich möglicherweise auf die unterschiedliche Kulturdauer der organotypischen Hautkulturen zurückführen. In den Untersuchungen dieser Arbeit wuchsen die infizierten HPK 10 Tage, im Vergleich zu 14 Tagen, auf einer de-epidermalisierten Dermis. Unter Umständen hätte eine längere Differenzierung der HPK zu einem ausgeprägteren invasiven Phänotyp führen können. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Herkunft der HPK. Da diese aus verschiedenen Patienten isoliert worden sind, verhalten sich die Zellen möglicherweise unterschiedlich.

Weiterhin wurde von Akgul et al. (2005) eine Degradation der Basalmembran sowie invadierendes Wachstum von Keratinozyten gezeigt. Dieses invasive Verhalten von HPV 8 E7-infizierten HPK in einem *in vivo* Hautmodell kann durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bestätigt werden. Invasive SCC bestehen histologisch aus atypischen epithelialen Keratinozytennestern mit Kern- und Zellatypien, die über die Epidermis hinaus in die unterliegende Dermis reichen

Tenascin-C ist ein Protein der ECM, das in Tumoren verstärkt exprimiert wird (Chiquet-Ehrismann und Chiquet, 2003). In melanozytären Hauttumoren korreliert die Expression des Proteins mit der Progression von benignen Läsionen zu invasiven Tumoren (van Duinen et al., 1994). Dies konnte von unserer Arbeitsgruppe für kutane SCC bestätigt werden (Dang et al., 2006a). In der vorliegenden Arbeit wurde Tenascin-C im *Stratum papillare* der E7-Hautkulturen von HPV 4, 8, 38 und RTRX7 verstärkt exprimiert. Die Expression des Proteins nimmt in potentiellen epithelialen Grenzgeweben mit der Initiation eines malignen Zellwachstums besonders stark zu. Dies spricht für eine invasive Zelltransformation von E7 dieser kutanen HPV-Typen in HPK und bestätigt das invasive Potential von HPV 8 E7. In Versuchen mit einschichtigen E7-infizierten HPK konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Invasion der Zellen in sogenanntem „Soft Agar“ oder durch Matrigel gezeigt werden. Es scheint also eine Voraussetzung zu sein, ein differenziertes Epithel, wie organotypische Hautkulturen für Invasionsstudien zu verwenden, da die Polarisierung, Differenzierung und Interaktion der basalen Keratinozyten eine intakte Basalmembran erfordert (Manes et al., 2000). Eine obligatorische Auswirkung der Invasion von Zellen ist das „Durchbrechen“ der Basalmembran. In der Studie von Akgul et al. (2005) konnte in HPV 8 E7 Hautkulturen eine lokale Destruktion der Basalmembran gezeigt werden. Auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit basierend, muss weiterführend untersucht werden, ob auch durch die E7-Expression von HPV 4, 8, 38 und RTRX7 eine Degradation der Basalmembran induziert wird. Dies könnte mit immunhistochemischen Färbungen gegen Kollagen VII oder weitere Bestandteile der Basalmembran nachgewiesen werden.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen für eine Rolle der E6 und E7-Proteine kutaner HPV bei der *in vitro*-Zelltransformation von Keratinozyten. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression kutaner E6 oder E7 eine Verlängerung der Lebensspanne in HPK induziert, die nicht allein auf die Aktivierung der zellulären Telomerase zurückzuführen zu sein scheint. Mechanismen die, synergistisch oder allein, in den Prozess der Proliferationsfähigkeit von Keratinozyten, nach Infektion mit kutanen HPV, eingreifen

sind noch ungeklärt. Eine Schädigung der Haut durch UV-B-Strahlung ist der Hauptrisikofaktor für die Entstehung kutaner Tumore. Weitere Untersuchungen mit E6 oder E7-infizierten HPK und UV-B-Bestrahlung können helfen, auch diesen ätiologischen Faktor in funktionelle Analysen mit einzubeziehen.

Mit Hilfe organotypischer Hautkulturen wurden interessante Eigenschaften für kutane HPV E7 beschrieben, die bei einer virusinduzierten Karzinogenese *in vivo* eine Rolle spielen könnten. Die Expression kutaner E7-Proteine in HPK induzierte histologische Abberationen und Veränderungen der Differenzierung im Epithel, die *in vivo* ebenfalls in kutanen Läsionen zu finden sind. Auch das Umgehen des G1/S-Phase-Stops des Zellzyklus und ein invasives Potential einiger kutaner HPV-Typen sprechen unter Umständen für eine initiale Beteiligung dieser Viren an der Entstehung von Hauttumoren. Allerdings verläuft die Transformation von Keratinozyten *in vivo* sehr viel langsamer (Jahre bis Jahrzehnte), als mit in dieser Arbeit verwendeten organotypischen Hautkulturen (10 Tage). Dieser zeitliche Unterschied zwischen den *in vitro* Bedingungen und der eigentlichen *in vivo* Situation beruht auf der einen Seite auf der Hyperproliferativität der HPK in dem Kultursystem „Organotypisches Hautmodell“. Andererseits wird das E7-Protein in organotypischen Hautmodellen differenzierungsunabhängig in allen Strata der Epidermis stabil exprimiert. In kutanen Aktinischen Keratosen und SCC von Patienten sind allerdings nur wenige E7-Transkripte nachweisbar.

In Zervixkarzinomzellen werden die viralen Onkogene E6 und E7 konstitutiv exprimiert. Mit Hilfe organotypischer Hautmodelle und HPK die mit E6/E7 kutaner HPV infiziert werden, könnte das Zusammenspiel dieser beiden frühen viralen Gene untersucht werden. Zum Aufbau organotypischer Hautmodelle wurde in verschiedenen Studien überwiegend eine murine Kollagenmatrix mit mukosalen Keratinozyten aus der Vorhaut verwendet. HPV sind assoziiert mit mukosalen oder kutanen Läsionen. Dieser strikte Tropismus legt nahe, dass der virale Replikationszyklus zelluläre Faktoren benötigt, die nur in Keratinozyten des assoziierten Epithels vorhanden sind. Demnach sollten für Untersuchungen kutaner HPV-Typen ebenfalls HPK der adulten Haut verwendet werden. Das organotypische Hautkulturmodell mit einer de-epidermalisierten, humanen Dermis und HPK sollte die Methode der Wahl sein, um die Mechanismen der Onkoproteine E6 und/oder E7 kutaner Papillomviren unter Berücksichtigung der epitelialen Differenzierung zu untersuchen.

5 Literaturverzeichnis

1. Aguilar-Lemarroy, A., P.Gariglio, N.J.Whitaker, S.T.Eichhorst, H.zurHausen, P.H.Krammer, and F.Rösl. 2002. Restoration of p53 expression sensitizes human papillomavirus type 16 immortalized human keratinocytes to CD95-mediated apoptosis. *Oncogene*. 21(2):165-175.
2. Akgul, B., J.C.Cooke, and A.Storey. 2006. HPV-associated skin disease. *J Pathol*. 208(2):165-175.
3. Akgul, B., R.Garcia-Escudero, L.Ghali, H.J.Pfister, P.G.Fuchs, H.Navaria, and A.Storey. 2005. - The E7 protein of cutaneous human papillomavirus type 8 causes invasion of human keratinocytes into the dermis in organotypic cultures of skin. *Cancer Res*. 65(6):2216-2223.
4. Albini, A., Y.Iwamoto, H.K.Kleinman, G.R.Martin, S.A.Aaronson, J.M.Kozlowski, and R.N.McEwan. 1987. - A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res*. 47(12):3239-3245.
5. Ananthaswamy, H.N. and W.E.Pierceall. 1990. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *Photochem Photobiol*. 52(6):1119-1136.
6. Asbill, C., N.Kim, A.El-Kattan, K.Creek, P.Wertz, and B.Michniak. 2000. Evaluation of a human bio-engineered skin equivalent for drug permeation studies. *Pharm Res*. 17(9):1092-1097.
7. Baker, C.C., W.C.Phelps, V.Lindgren, M.J.Braun, M.A.Gonda, and P.M.Howley. 1987. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J. Virol*. 61(4):962-971.
8. Banerjee, N.S., N.J.Genovese, F.Noya, W.M.Chien, T.R.Broker, and L.T.Chow. 2006. Conditionally activated E7 proteins of high-risk and low-risk human papillomaviruses induce S phase in postmitotic, differentiated human keratinocytes. *J. Virol*. 80(13):6517-6524.
9. Bavinck, J.N., B.A.De, B.J.Vermeer, M.M.Harteveld, F.J.van der Woude, F.H.Claas, R.Wolterbeek, and J.P.Vandenbroucke. 1993. Sunlight, keratotic skin lesions and skin cancer in renal transplant recipients. *Br J Dermatol*. 129(3):242-249.
10. Bedard, K.M., M.P.Underbrink, H.L.Howie, and D.A.Galloway. 2008. The E6 oncoproteins from human betapapillomaviruses differentially activate telomerase through an E6AP-dependent mechanism and prolong the lifespan of primary keratinocytes. *J Virol*. 82(8):3894-3902.

11. Bell, E., S.Sher, B.Hull, C.Merrill, S.Rosen, A.Chamson, D.Asselineau, L.Dubertret, B.Coulomb, C.Lapiere, B.Nusgens, and Y.Neveux. 1983. The reconstitution of living skin. *J Invest Dermatol.* 81(suppl.1): S2-S10.
12. Berg, R.J., S.C.de Bueger, K.Guikers, H.vanWeelden, W.A.van Vloten, J.C.van der Leun, and F.R.de Gruijl. 1995. Induction and disappearance of thymine dimers in human skin exposed to UVB radiation: flow cytometric measurements in replicating and nonreplicating epidermal cells. *Photochem Photobiol.* 62(6):970-975.
13. Berger, T.G., W.S.Sawchuk, C.Leonardi, A.Langenberg, J.Tappero, and P.E.Leboit. 1991. Epidermodysplasia verruciformis-associated papillomavirus infection complicating human immunodeficiency virus disease. *Br J Dermatol.* 124(1):79-83.
14. Berkhout, R.J., J.N.Bouwes Bavinck, and J.terScheget. 2000. Persistence of human papillomavirus DNA in benign and (pre)malignant skin lesions from renal transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 38(6):2087-2096.
15. Bernard, H.U. 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol.* 32(suppl.1):S1-S6.
16. Boshart, M., L.Gissmann, H.Ikenberg, A.Kleinheinz, W.Scheurlen, and H.zurHausen. 1984. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.* 3(5):1151-1157.
17. Boxman, I.L., R.J.Berkhout, L.H.Mulder, M.C.Wolkers, J.N.Bouwes Bavinck, B.J.Vermeer, and J.terScheget. 1997. Detection of human papillomavirus DNA in plucked hairs from renal transplant recipients and healthy volunteers. *J Invest Dermatol.* 108(5):712-715.
18. Boxman, I.L., L.H.Mulder, F.Noya, V.deWaard, S.Gibbs, T.R.Broker, F.tenKate, L.T.Chow, and J.terScheget. 2001. Transduction of the E6 and E7 genes of epidermodysplasia-verruciformis-associated human papillomaviruses alters human keratinocyte growth and differentiation in organotypic cultures. *J. Invest Dermatol.* 117(6):1397-1404.
19. Boxman, I.L., L.H.Mulder, A.Russell, J.N.Bouwes Bavinck, A.Green, and J.terScheget. 1999. Human papillomavirus type 5 is commonly present in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *Br J Dermatol.* 141(2):246-249.
20. Boyle, J., R.M.MacKie, J.D.Briggs, B.J.Junor, and T.C.Aitchison. 1984. Cancer, warts, and sunshine in renal transplant patients. A case-control study. *Lancet.* 1(8379):702-705.

21. Brash, D.E., J.A.Rudolph, J.A.Simon, A.Lin, G.J.McKenna, H.P.Baden, A.J.Halperin, and J.Ponten. 1991. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(22):10124-10128.
22. Breuninger, H., F. Bootz , A. Hauschild, R.D. Kortmann, K. Wolff, E. Stockfleth, M. Szeimies, R. Rompel, C. Garbe. 2008. Short German guidelines: squamous cell carcinoma. *J Dtsch Dermatol Ges.* 6(suppl 1): S5-8.
23. Caldeira, S., I.Zehbe, R.Accardi, I.Malanchi, W.Dong, M.Giarre, E.M.de Villiers, R.Filotico, P.Boukamp, and M.Tommasino. 2003. The E6 and E7 proteins of the cutaneous human papillomavirus type 38 display transforming properties. *J. Virol.* 77(3):2195-2206.
24. Cheng, S., D.C.Schmidt-Grimminger, T.Murant, T.R.Broker, and L.T.Chow. 1995. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev.* 9(19):2335-2349.
25. Chiquet-Ehrismann, R. and M.Chiquet. 2003. Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol.* 200(4):488-499.
26. Chow, L.T. and T.R.Broker. 1997. In vitro experimental systems for HPV: epithelial raft cultures for investigations of viral reproduction and pathogenesis and for genetic analyses of viral proteins and regulatory sequences. *Clin. Dermatol.* 15(2):217-227.
27. Dang, C., M.Gottschling, J.Roewert, T.Forschner, E.Stockfleth, and I.Nindl. 2006a. Tenascin-C patterns and splice variants in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma. *Br. J. Dermatol.* 155(4):763-770.
28. Dang, C., A.Koehler, T.Forschner, P.Sehr, K.Michael, M.Pawlita, E.Stockfleth, and I.Nindl. 2006b. E6/E7 expression of human papillomavirus types in cutaneous squamous cell dysplasia and carcinoma in immunosuppressed organ transplant recipients. *Br. J. Dermatol.* 155(1):129-136.
29. Darr, D. and I.Fridovich. 1994. Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol.* 102(5):671-675.
30. de Gruijl, F.R. and P.D.Forbes. 1995. UV-induced skin cancer in a hairless mouse model. *Bioessays.* 17(7).651-660.
31. de Villiers, E.M., C.Fauquet, T.R.Broker, H.U.Bernard, and H.zurHausen. 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology* 324(1):17-27.
32. DePinho, R.A. 2000. The age of cancer. *Nature.* 408(6809):248-254.

33. Diepgen, T.L. and V.Mahler. 2002. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol.* 146(suppl.61):1-6.
34. Donnellan, R. and R.Chetty. 1999. Cyclin E in human cancers. *Faseb J.* 13(8):773-780.
35. Doorbar, J. 2005. The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virol.* 32(suppl.1):S7-S15.
36. Dyson, N., P.M.Howley, K.Münger, and E.Harlow. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 243(4893):934-937.
37. Elbel, M., S.Carl, S.Spaderna, and T.Iftner. 1997. A comparative analysis of the interactions of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential. *Virology.* 239(1):132-149.
38. Elgui de, O.D. 2007. DNA viruses in human cancer: an integrated overview on fundamental mechanisms of viral carcinogenesis. *Cancer Lett.* 247(2):182-196.
39. Euvrard, S., J.Kanitakis, and A.Claudy. 2003. Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med.* 348(17):1681-1691.
40. Favre, M., G.Orth, O.Croissant, and M.Yaniv. 1977. Human papillomavirus DNA: physical mapping of the cleavage sites of *Bacillus amyloliquefaciens* (BamI) and *Haemophilus parainfluenzae* (HpaII) endonucleases and evidence for partial heterogeneity. *J Virol.* 21(3):1210-1214.
41. Fu, B., J.Quintero, C.C.Baker, 2003. Keratinocyte growth conditions modulate telomerase expression, senescence, and immortalization by human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncogenes. *Cancer Res.* 63 (22):7815-7824.
42. Fehrmann, F. and L.A.Laimins. 2003. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene.* 22(33):5201-5207.
43. Gewin, L. and D.A.Galloway. 2001. E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. *J Virol.* 75(15):7198-7201.
44. Grossman, S.R. and L.A.Laimins. 1989. E6 protein of human papillomavirus type 18 binds zinc. *Oncogene.* 4(9):1089-1093.

45. Hauschild, A., H. Breuninger, R. Kaufmann, R.D. Kortmann, V. Schwipper, J. Werner, J. Reifemberger, T. Dirscha, C. Garbe. 2008. Short German guidelines: basal cell carcinoma. *J Dtsch Dermatol Ges.* 6(suppl 1): S2-4.
46. Halbert, C.L., G.W.Demers, and D.A.Galloway. 1991. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol.* 65(1):473-478.
47. Halbert, C.L., G.W.Demers, and D.A.Galloway. 1992. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *J Virol.* 66(4):2125-2134.
48. Hall, A., C.J.Marshall, N.K.Spurr, and R.A.Weiss. 1983. Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. *Nature.* 303(5916):396-400.
49. Hanahan, D. and R.A.Weinberg. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell.* 100(1):57-70.
50. Harwood, C.A., J.M.McGregor, C.M.Proby, and J.Breuer. 1999. Human papillomavirus and the development of non-melanoma skin cancer. *J. Clin. Pathol.* 52(4):249-253.
51. Harwood, C.A., T.Surentheran, J.M.McGregor, P.J.Spink, I.M.Leigh, J.Breuer, and C.M.Proby. 2000. Human papillomavirus infection and non-melanoma skin cancer in immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J. Med. Virol.* 61(3):289-297.
52. Harwood, C.A., T.Surentheran, P.Sasieni, C.M.Proby, C.Bordea, I.M.Leigh, F.Wojnarowska, J.Breuer, and J.M.McGregor. 2004. Increased risk of skin cancer associated with the presence of epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus types in normal skin. *Br. J. Dermatol.* 150(5):949-957.
53. Hawley-Nelson, P., K.H.Vousden, N.L.Hubbert, D.R.Lowy, and J.T.Schiller. 1989. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *Embo J.* 8(12):3905-3910.
54. Hopfl, R., G.Bens, U.Wieland, A.Petter, B.Zelger, P.Fritsch, and H.Pfister. 1997. Human papillomavirus DNA in non-melanoma skin cancers of a renal transplant recipient: detection of a new sequence related to epidermodysplasia verruciformis associated types. *J Invest Dermatol.* 108(1):53-56.
55. Hudson, J.B., M.A.Bedell, D.J.McCance, and L.A.Laiminis. 1990. Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. *J Virol.* 64(2):519-526.

56. Iftner, T., S.Bierfelder, Z.Csapo, and H.Pfister. 1988. Involvement of human papillomavirus type 8 genes E6 and E7 in transformation and replication. *J Virol.* 61(10):3655-3661.
57. Jablonska, S., J.Dabrowski, and K.Jakubowicz. 1972. Epidermodysplasia verruciformis as a model in studies on the role of papovaviruses in oncogenesis. *Cancer Res.* 32(3):583-589.
58. Jablonska, S., G.Orth, M.Jarzabek-Chorzelska, S.Obalek, G.Rzesa, O.Croissant, and M.Favre. 1979. New developments relating to papillomaviruses. *Hautarzt.* 30(8):411-417.
59. Jackson, S., C.Harwood, M.Thomas, L.Banks, and A.Storey. 2000. Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins. *Genes Dev.* 14(23):3065-3073.
60. Joyce, J.G., J.S.Tung, C.T.Przysiecki, J.C.Cook, E.D.Lehman, J.A.Sands, K.U.Jansen, and P.M.Keller. 1999. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem.* 274(9):5810-5822.
61. Junqueira, L.C., J.Carneiro, and T.H.Schiebler. 1996. Histologie. Springer, 4.Auflage.
62. Karagas, M.R., H.H.Nelson, P.Sehr, T.Waterboer, T.A.Stukel, A.Andrew, A.C.Green, J.N.Bavinck, A.Perry, S.Spencer, J.R.Rees, L.A.Mott, and M.Pawlita. 2006. Human papillomavirus infection and incidence of squamous cell and basal cell carcinomas of the skin. *J Natl Cancer Inst.* 98(6):389-395.
63. Kim, N.W., M.A.Piatyszek, K.R.Prowse, C.B.Harley, M.D.West, P.L.Ho, G.M.Coviello, W.E.Wright, S.L.Weinrich, and J.W.Shay. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 266(5193):2011-2015.
64. Kiyono, T., S.A.Foster, J.I.Koop, J.K.McDougall, D.A.Galloway, and A.J.Klingelutz. 1998. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature.* 396(6706):84-88.
65. Klingelutz, A.J., S.A.Foster, and J.K.McDougall. 1996. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature.* 386(6569):79-82.
66. Köhler, A., T.Forschner, T.Meyer, C.Ulrich, M.Gottschling, E.Stockfleth, and I.Nindl. 2007. Multifocal distribution of cutaneous human papillomavirus types in hairs from different skin areas. *Br. J. Dermatol.* 156(5):1078-1080.

67. Kremsdorf, D., M.Favre, S.Jablonska, S.Obalek, L.A.Rueda, M.A.Lutzner, C.Blanchet-Bardon, P.C.vanVoorstVader, and G.Orth. 1984. Molecular cloning and characterization of the genomes of nine newly recognized human papillomavirus types associated with epidermodysplasia verruciformis. *J Virol.* 52(3):1013-1018.
68. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-685.
69. Laimins, L.A. 1993. The biology of human papillomaviruses: from warts to cancer. *Infect Agents Dis.* 2(2):74-86.
70. Lane, D.P. and L.V.Crawford. 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature.* 278(5701):261-263.
71. Luria, S.E., J.N.Adams, and R.C.Ting. 1960. Transduction of lactose-utilizing ability among strains of *E. coli* and *S. dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles. *Virology.* 12:348-390.
72. Manes, S., E.Mira, C.Gomez-Mouton, R.A.Lacalle, and C.Martinez. 2000. Cells on the move: a dialogue between polarization and motility. *IUBMB Life.* 49(2):89-96.
73. Marks, R., G.Rennie, and T.S.Selwood. 1988. Malignant transformation of solar keratoses to squamous cell carcinoma. *Lancet.* 1(8589):795-797.
74. Meyer, T., R.Arndt, I.Nindl, C.Ulrich, E.Christophers, and E.Stockfleth. 2003. Association of human papillomavirus infections with cutaneous tumors in immunosuppressed patients. *Transpl Int.* 16(3):146-153.
75. Miller, A.D. and F.Chen. 1996. Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry. *J Virol.* 70(8):5564-5571.
76. Miller, D.L. and M.A.Weinstock. 1994. Nonmelanoma skin cancer in the United States: incidence. *J Am Acad Dermatol.* 30(5pt.1):774-778.
77. Moll, R., M.Divo, and L.Langbein. 2008. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol.* 129(6):705-733.
78. Moll, R., W.W.Franke, B.Volc-Platzer, and R.Krepler. 1982. Different keratin polypeptides in epidermis and other epithelia of human skin: a specific cytokeratin of molecular weight 46,000 in epithelia of the pilosebaceous tract and basal cell epitheliomas. *J Cell Biol.* 95(1):285-295.

79. Münger, K. and P.M.Howley. 2002. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 89(2):213-228.
80. Münger, K., B.A.Werness, N.Dyson, W.C.Phelps, E.Harlow, and P.M.Howley. 1989. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *Embo J.* 8(13):4099-4105.
81. Munoz, N., F.X.Bosch, S.deSanjose, R.Herrero, X.Castellsague, K.V.Shah, P.J.Snijders, and C.J.Meijer. 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 348(6):518-527.
82. Murphy, G.F., T.C.Flynn, R.H.Rice, and G.S.Pinkus. 1984. Involucrin expression in normal and neoplastic human skin: a marker for keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol.* 82(5):453-457.
83. Murphy, N., M.Ring, A.G.Killalea, V.Uhlmann, M.O'Donovan, F.Mulcahy, M.Turner, E.McGuinness, M.Griffin, C.Martin, O.Sheils, and J.J.O'Leary. 2003. p16INK4A as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol.* 56(1):5663.
84. Nakamura, T.M., G.B.Morin, K.B.Chapman, S.L.Weinrich, W.H.Andrews, J.Lingner, C.B.Harley, and T.R.Cech. 1997. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science.* 277(5328):955-959.
85. Narechania, A., Z.Chen, R.Desalle, and R.D.Burk. 2005. Phylogenetic incongruence among oncogenic genital alpha human papillomaviruses. *J Virol.* 79(24):15503-15510.
86. Nataraj, A.J., J.C.Trent, and H.N.Ananthaswamy. 1995. p53 gene mutations and photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol.* 62(2):218-230.
87. Naviaux, R.K. and I.M.Verma. 1992. Retroviral vectors for persistent expression in vivo. *Curr Opin Biotechnol.* 3(5):540-547.
88. Nindl, I., M.Gottschling, N.Krawtchenko, M.D.Lehmann, J.Rowert-Huber, J.Eberle, E.Stockfleth, and T.Forschner. 2007. Low prevalence of p53, p16(INK4a) and Ha-ras tumour-specific mutations in low-graded actinic keratosis. *Br. J. Dermatol.* 156(suppl. 3):34-39.
89. Nindl, I., A.Koehler, T.Meyer, T.Forschner, C.J.Meijer, P.J.Snijders, W.Sterry, and E.Stockfleth. 2006. Detection of human papillomavirus DNA in primary squamous cell carcinoma and metastases. *Br. J. Dermatol.* 154(4):797-799.

90. Nindl, I., T.Meyer, T.Schmook, C.Ulrich, R.Ridder, H.Audring, W.Sterry, and E.Stockfleth. 2004. Human papillomavirus and overexpression of p16^{INK4a} in nonmelanoma skin cancer. *Dermatol. Surg.* 30(3):409-414.
91. Noel, J.C., O.Detremmerie, M.O.Peny, M.Candaele, A.Verhest, M.Heenen, and G.DeDobbeleer. 1994. Transformation of common warts into squamous cell carcinoma on sun-exposed areas in an immunosuppressed patient. *Dermatology.* 189(3):308-311.
92. Orth, G., S.Jablonska, M.Favre, O.Croissant, M.Jarzabek-Chorzelska, and G.Rzesa. 1978. Characterization of two types of human papillomaviruses in lesions of epidermodysplasia verruciformis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(3):1537-1541.
93. Ostrow, R.S., M.Bender, M.Niimura, T.Seki, M.Kawashima, F.Pass, and A.J.Faras. 1982. Human papillomavirus DNA in cutaneous primary and metastasized squamous cell carcinomas from patients with epidermodysplasia verruciformis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79(5):1634-1638.
94. Palefsky, J. 1991. Human papillomavirus infection among HIV-infected individuals. Implications for development of malignant tumors. *Hematol Oncol Clin North Am.* 5(2):357-370.
95. Parkin, D.M. 2001. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2(9):533-543.
96. Parkin, D.M., F.Bray, J.Ferlay, and P.Pisani. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 55(2):74-108.
97. Parry, D., S.Bates, D.J.Mann, and G.Peters. 1995. Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. *Embo J.* 14(3):503-511.
98. Pfister, H. 2003. Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr* (31):52-56.
99. Pfister, H. and P.G.Fuchs. 1987. Papillomaviruses and human diseases. In *Papillomaviruses: particles, genome organization and proteins*, pp.1-18. Edited by K. Syrjanen, L. Gissmann & L.G.Koss.
100. Pfister, H., P.G.Fuchs, S.Majewski, S.Jablonska, I.Pniewska, and M.Malejczyk. 2003. High prevalence of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus DNA in actinic keratoses of the immunocompetent population. *Arch Dermatol Res.* 295(7):273-279.

101. Plug-DeMaggio, A.W., T.Sundsvold, M.A.Wurscher, J.I.Koop, A.J.Klingelhutz, and J.K.McDougall. 2004. Telomere erosion and chromosomal instability in cells expressing the HPV oncogene 16E6. *Oncogene*. 23(20):3561-3571.
102. Poumay, Y., F.Dupont, S.Marcoux, M.Leclercq-Smekens, M.Herin, and A.Coquette. 2004. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Arch Dermatol Res*. 296(5):203-211.
103. Prunieras, M., M.Regnier, and D.Woodley. 1983. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol*. 81(suppl.1):S28-S33.
104. Purdie, K.J., T.Surentheran, J.C.Sterling, L.Bell, J.M.McGregor, C.M.Proby, C.A.Harwood, and J.Breuer. 2005. Human papillomavirus gene expression in cutaneous squamous cell carcinomas from immunosuppressed and immunocompetent individuals. *J. Invest Dermatol*. 125(1):98-107.
105. Regnier, M., D.Caron, U.Reichert, and H.Schaefer. 1992. Reconstructed human epidermis: a model to study in vitro the barrier function of the skin. *Skin Pharmacol*. 5(1):49-56.
106. Rheinwald, J.G. and H.Green. 1975. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. 6(3):331-343.
107. Rohde, V., H.J.Sommerfeld, H.P.Sattler, B.Wullich B. 1998. Telomerase in tumors: facts and perspectives. *Urologe[A]*. 37(4):386-394.
108. R nger, T.M., B.Epe, and K.M ller. 1995. Processing of directly and indirectly ultraviolet-induced DNA damage in human cells. *Recent Results Cancer Res*. 139:31-42.
109. Salasche, S.J. 2000. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 42(pt.2)4-7.
110. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
111. Sato, H., S.Watanabe, A.Furuno, and K.Yoshiike. 1989. Human papillomavirus type 16 E7 protein expressed in Escherichia coli and monkey COS-1 cells: immunofluorescence detection of the nuclear E7 protein. *Virology*. 170(1):311-315.

112. Scheffner, M., B.A.Werness, J.M.Huibregtse, A.J.Levine, and P.M.Howley. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 63(6):1129-1136.
113. Scheurlen, W., L.Gissmann, G.Gross, and H.zurHausen. 1986. Molecular cloning of two new HPV types (HPV 37 and HPV 38) from a keratoacanthoma and a malignant melanoma. *Int J Cancer*. 37(4):505-510.
114. Schlegel, R., W.C.Phelps, Y.L.Zhang, and M.Barbosa. 1988. Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. *Embo J*. 7(10):3181-3187.
115. Schmitt, A., J.B.Harry, B.Rapp, F.O.Wettstein, and T.Iftner. 1994. Comparison of the properties of the E6 and E7 genes of low- and high-risk cutaneous papillomaviruses reveals strongly transforming and high Rb-binding activity for the E7 protein of the low-risk human papillomavirus type 1. *J Virol*. 68(11):7051-7059.
116. Schwarz, E., U.K.Freese, L.Gissmann, W.Mayer, B.Roggenbuck, A.Stremlau, and H.zurHausen. 1985. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*. 314(6006):111-114.
117. Shafti-Keramat, S., A.Handisurya, E.Kriehuber, G.Meneguzzi, K.Slupetzky, and R.Kirnbauer. 2003. Different heparan sulfate proteoglycans serve as cellular receptors for human papillomaviruses. *J Virol*. 77(24):13125-13135.
118. Shamanin, V., H.zurHausen, D.Lavergne, C.M.Proby, I.M.Leigh, C.Neumann, H.Hamm, M.Goos, U.F.Haustein, E.G.Jung, G.Plewig, H.Wolff, and E.M.de Villiers. 1996. Human papillomavirus infections in nonmelanoma skin cancers from renal transplant recipients and nonimmunosuppressed patients. *J Natl Cancer Inst*. 88(12):802-811.
119. Shay, J.W., Y.Zou, E.Hiyama, and W.E.Wright. 2001. Telomerase and cancer. *Hum Mol Genet*. 10(7):677-685.
120. Shea, C. and Parrish.J. 1993. Non ionising radiation and the skin. In: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin.Edited by Goldsmith, L.
121. Smith, P.K., R.I.Krohn, G.T.Hermanson, A.K.Mallia, F.H.Gartner, M.D.Provenzano, E.K.Fujimoto, N.M.Goeke, B.J.Olson, and D.C.Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 150(1):76-85.

122. Smola-Hess, S., J.Pahne, C.Mauch, P.Zigrino, H.Smola, and H.J.Pfister. 2005. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase in papillomavirus-positive cells: role of the human papillomavirus (HPV) 16 and HPV8 E7 gene products. *J Gen Virol.* 86(pt.5):1291-1296.
123. Specht, C., I.Stoye, and C.C.Müller-Goymann. 1998. Comparative investigations to evaluate the use of organotypic cultures of transformed and native dermal and epidermal cells for permeation studies. *Eur J Pharm Biopharm.* 46(3):273-278.
124. Steger, G. and H.Pfister. 1992. In vitro expressed HPV 8 E6 protein does not bind p53. *Arch Virol.* 125(1-4):355-360.
125. Steinert, P.M. and L.N.Marekov. 1995. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem.* 270(30):17702-17711.
126. Stockfleth, E., C.Ulrich, T.Meyer, R.Arndt, and E.Christophers. 2001. Skin diseases following organ transplantation-risk factors and new therapeutic approaches. *Transplant Proc.* 33(1-2):1848-53.
127. Stubenrauch, F. and L.A.Laimins. 1999. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. - *Semin Cancer Biol.* 9(6):379-386.
128. Thomas, J.T., S.T.Oh, S.S.Terhune, and L.A.Laimins. 2001. Cellular changes induced by low-risk human papillomavirus type 11 in keratinocytes that stably maintain viral episomes. *J Virol.* 75(16):7564-7571.
129. Thomas, M. and L.Banks. 1998. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene.* 17(23):2943-2954.
130. Tilgen, W., P.Boukamp, D.Breitkreutz, R.T.Dzarlieva, M.Engstner, D.Haag, and N.E.Fusenig. 1983. Preservation of morphological, functional, and karyotypic traits during long-term culture and in vivo passage of two human skin squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* 43(12pt.1):5995-6011.
131. Tomkova, H., W.Fujimoto, and J.Arata. 1997. Expression of bcl-2 antagonist bak in inflammatory and neoplastic skin diseases. *Br J Dermatol.* 137(5):703-708.
132. van Duinen, C.M., G.J.Fleuren, and J.A.Bruijn. 1994. The extracellular matrix in pigmented skin lesions: an immunohistochemical study. *Histopathology.* 24(1):33-40.

133. van Regenmortel, M.H., M.A.Mayo, C.M.Fauquet, and J.Maniloff. 2000. Virus nomenclature: consensus versus chaos. *Arch Virol.* 32.
134. Veldman, T., I.Horikawa, J.C.Barrett, and R.Schlegel. 2001. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol.* 75(9):4467-4472.
135. Walboomers, J.M., M.V.Jacobs, M.M.Manos, F.X.Bosch, J.A.Kummer, K.V.Shah, P.J.Snijders, J.Peto, C.J.Meijer, and N.Munoz. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 189(1):1-3.
136. Waterboer, T., D.Abeni, F.Sampogna, A.Rother, C.Masini, P.Sehr, K.M.Michael, and M.Pawlita. 2008. Serological association of beta and gamma human papillomaviruses with squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol.* 159(2):457-459.
137. Werness, B.A., A.J.Levine, and P.M.Howley. 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science.* 248(4951):76-79.
138. Zantema, A., P.I.Schrier, A.Davis-Olivier, T.vanLaar, R.T.Vaessen, and A.J.van der Eb. 1985. Adenovirus serotype determines association and localization of the large E1B tumor antigen with cellular tumor antigen p53 in transformed cells. *Mol Cell Biol.* 5(11):3084-3091.
139. Zheng, Z.M. and C.C.Baker. 2006. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 11:2286-2302.
140. Ziegler, A., D.J.Leffell, S.Kunala, H.W.Sharma, M.Gailani, J.A.Simon, A.J.Halperin, H.P.Baden, P.E.Shapiro, and A.E.Bale. 1993. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(9):4216-4220.
141. Zieske, J.D., V.S.Mason, M.E.Wasson, S.F.Meunier, C.J.Nolte, N.Fukai, B.R.Olsen, and N.L.Parenteau. 1994. Basement membrane assembly and differentiation of cultured corneal cells: importance of culture environment and endothelial cell interaction. *Exp Cell Res.* 214(2):621-633.
142. zur Hausen, H. 1987. Papillomaviruses in human cancer. *Cancer.* 59(10):1692-1696.
143. zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2(5):342-350.

Anhang

i Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Charakteristisches Expressionsmuster ausgewählter Zytokeratine.....	5
Tabelle 2.1:	Papillomvirus-Plasmide	17
Tabelle 2.2:	Retrovirale Plasmide	17
Tabelle 2.3:	Zur Transfektion in pT67 verwendete pLXSN-Plasmide	17
Tabelle 2.4:	Synthetische Oligonukleotide für Klonierungen.....	18
Tabelle 2.5:	Synthetische Oligonukleotide für Expressionsuntersuchungen (RT-PCR).....	19
Tabelle 2.6:	Synthetische Oligonukleotide für Mykoplasmen und hTERT-Expression.....	20
Tabelle 2.7:	Primärantikörper für Immunhistochemie bzw. Immuncytochemie	20
Tabelle 2.8:	Sekundärantikörper für Immunhistochemie.....	21
Tabelle 2.9:	Primärantikörper für Western Blot Analyse.....	22
Tabelle 2.10:	Sekundärantikörper für Western Blot Analysen	22
Tabelle 2.11:	Klonierte pLXSN-HPV E6 oder E7-Plasmide	32
Tabelle 2.12:	Verwendete Patientenproben und durchgeführte Untersuchungen.....	38
Tabelle 3.1:	Untersuchte kutane HPV-Typen verschiedener Taxa	48
Tabelle 3.2:	Überblick über beobachtete Effekte der verschiedenen Untersuchungen.....	67

ii Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Mehrstufiges Karzinogenesemodell nach Hanahan und Weinberg.....	3
Abbildung 1.2:	Aufbau der menschlichen Haut.	4
Abbildung 1.3:	Genomorganisation von HPV 8 (beta-HPV).	9
Abbildung 1.4:	Telomer-Hypothese der Zellalterung und Immortalisierung.....	11
Abbildung 1.5:	Regulation des Zellzyklus durch pRb und p16 ^{INK4a}	12
Abbildung 1.6:	Darstellung der Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	14
Abbildung 2.1:	Analytischer Restriktionsverdau von pLXSN-HPV E6 oder E7.....	33
Abbildung 2.2:	Schematische Darstellung der Herstellung rekombinanter Retroviren	40
Abbildung 2.3:	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Invasion von SCL-II Zellen.....	43
Abbildung 3.1:	Expression von HPV E6- oder E7-mRNA in infizierten HPK.....	49
Abbildung 3.2:	Proteinnachweis von E6 oder E7 in retroviral infizierten HPK	50
Abbildung 3.3:	E6 verlängert die Lebensspanne von HPK.	52
Abbildung 3.4:	E7 verlängert die Lebensspanne in HPK.	53
Abbildung 3.5:	Expression von hTERT.....	54
Abbildung 3.6:	Keine Invasion mit HPV E6 oder E7 infizierten HPK	55
Abbildung 3.7:	Bak Expression in E6 infizierten HPK nach 25 mJ/cm ² UV-B Bestrahlung.	56
Abbildung 3.8:	Darstellung des organotypischen Hautmodells.	57
Abbildung 3.9:	Die Histologie ist in HPV E7 Hautkulturen verändert.	59
Abbildung 3.10:	Veränderte Differenzierung in HPV E7 Hautkulturen.	61
Abbildung 3.11:	Proliferation in E7-Hautkulturen.	63
Abbildung 3.12:	Suprabasale Ko-Lokalisation von Cyclin E und p16 ^{INK4a}	65
Abbildung 3.13:	Tenascin-C-Expression in E7-Hautkulturen.....	66

iii Abkürzungsverzeichnis

AEC	Aminoethylcarbazol
AK	Antikörper
Amp	Ampizillin
APS	Ammoniumpersulfat
<i>Aqua ini.</i>	<i>Aqua ad iniectabilia</i> , steriles Wasser
BCC	<i>basal cell carcinoma</i> , Basalzellkarzinom
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	<i>complementary DNA</i> , DNA-Kopie von mRNA
CK	Zytokeratin
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
Da	Dalton, Einheit der molekularen Masse
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
dsDNA	<i>double stranded DNA</i> , doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
(hu) EGF	(<i>human</i>) <i>epidermal growth factor</i> , humaner epidermaler Wachstumsfaktor
et al.	<i>et alii</i> , und andere
EV	<i>Epidermodysplasia verruciformis</i>
FCS	<i>fetal, calf serum</i> , fötales Kälberserum
h	<i>hour</i> , Stunde
HE	Hämaltoxylin-Eosin Färbung
HPF	Humane primäre Fibroblasten
HPK	Humane primäre Keratinozyten
HPV	Humane Papillomviren
HR	<i>high risk</i> , Hoch-Risiko(-HPV Typ)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich Peroxidase
IHC	Immunhistochemie
kb	Kilobasenpaare, 1 kb = 1000 bp
kDa	Kilodalton
LR	<i>low risk</i> , Niedrig-Risiko(-HPV Typ)
LTR	<i>long terminal repeat</i> , repetitive Nukleotidsequenz
MCS	<i>multiple cloning site</i> , multiple Klonierungsstelle
MG132	Z-Leu-Leu-Leu-CHO, Proteasominhibitor

MoMuLV	<i>Moloney-Murine-Leukemia-Virus</i>
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
N ₂	Stickstoff
NCR	<i>non coding region</i> , nicht kodierender Sequenzabschnitt
NH	Normalhaut
Nk	Negativkontrolle
NMSC	<i>non-melanoma skin cancer</i> , Nicht-melanozytäre Hauttumore
nu/nu	<i>nude mice</i> , Nacktmäuse
ori	<i>origin of replication</i> , Replikationsstart
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> , offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-Salz-Puffer
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
Pk	Positivkontrolle
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRb	Retinoblastom-Protein
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	<i>subcutan</i> , subkutan
SCC	<i>squamous cell carcinoma</i> , Plattenepithelkarzinom
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tab	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA Puffer
TBS	<i>tris buffered saline</i> , Tris-Borat-EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	<i>Unit</i> , Einheit der Enzymaktivität
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
WHO	<i>World Health Organization</i> , Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight/volume</i> , Masse/Volumen

Einheiten des Internationalen Einheitensystem (SI, Le Système international d'unités) wurden nach geltendem Gesetz verwendet.

Danksagung

Mein Dank gilt allen Personen, die maßgeblich am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

PD Dr. Ingo Nindl möchte ich danken für die Bereitstellung des Themas, Anregungen und die wissenschaftliche Betreuung. Herzlich danken möchte ich auch Prof. Detlef H. Krüger und Prof. Frank Rösl für die Beguachtung meiner Arbeit.

Prof. Alan Storey danke ich für die Möglichkeit die Methode des „Organotypischen Hautmodells“ in seiner Arbeitsgruppe zu erlernen. Dr. Baki Akgül und danke ich für die erfrischende Zusammenarbeit und die unzähligen Ideen um das Projekt anzutreiben; Dr. Metin Artuc für die Bereitstellung von Proben.

Ein grosser Dank gebührt der gesamten AG „Epitheliale Hauttumoren“ der Charité Berlin für die freundschaftliche Atmosphäre und das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere möchte ich danken: Dr. Anja Köhler für ihre Geduld, Mandy Lehmann für die technischen Hilfestellungen und Dr. Marc Gottschling für das kritische Lesen und die wertvollen Anmerkungen. Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der AG „Virale Transformationsmechanismen“ und des 1. OG Ost für die stete Unterstützung und die nahezu reibungslose Versorgung mit Schokolade. Besonderer Dank gebührt Simone Rosenberger für die Bereitstellung von Proteinlysaten und Antikörpern und Dr. Eva Kriehoff-Henning und Kai Schäfer für die aufgebrauchte Zeit und die wertvollen Vorschläge beim kritischen Lesen der Arbeit.

Boehringer Ingelheim und die Charité, Universitätsklinikum Berlin trugen mit ihren Stipendien wesentlich zur Durchführung des Projektes bei.

Am meisten verdanke ich meiner Familie, die mich stets in meinem Handeln bestärkt und uneingeschränkt unterstützt hat.

Publikationen

Westphal K., Akgül B., Storey A. and Nindl I. (2009). Cutaneous human papillomavirus E7 type-specific effects on differentiation and proliferation of organotypic skin cultures. *Cellular Oncology*. 31: 213-226.

Akgül B, Westphal K., Nindl I., Pfister H.J., Marshall S.W., Storey A. Activation of the canonical Wnt/beta-catenin signalling by human papillomavirus type 8-E7 and its role for keratinocyte invasion (*in Vorbereitung*)

Hemmer C.J., Lehr H.A., Westphal K., Unverricht M., Kratzius M., Reisinger E.C. (2005). Plasmodium falciparum malaria: Reduction of Endothelial Cell Apoptosis in vitro. *Infection and Immunity*. 73(3):1764-70.

Tagungsbeiträge

Westphal K., Akgül B., Storey A., Nindl I. (2007). Expression of E7 from cutaneous HPV types shows differential effects on differentiation and proliferation in organotypic skin cultures. Abstract, 24th International conference and clinical workshop, 03-09 November 2007, Peking, China. (*Poster*).

Westphal K., Akgül B., Storey A., Nindl I. (2007). Expression of E7 from cutaneous HPV types shows differential effects on differentiation and proliferation in organotypic skin cultures. Abstract, DNA Tumour Virus Meeting, 17-22 Juli 2007, Trieste, Italien. (*Vortrag & Poster*).

Westphal K., Akgül B., Stockfleth E., Storey A., Nindl I. (2006). E7 expression from cutaneous HPV types shows differential effects on differentiation and proliferation in organotypic skin cultures. Abstract, HPV and Cancer, 09-10. November 2006, Turin, Italien. (*Vortrag & Poster*).

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Diese Dissertation wurde in dieser oder anderer Form weder bereits als Prüfungsarbeit verwendet, noch einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt. An keiner anderen Stelle ist ein Prüfungsverfahren beantragt.

Heidelberg, September 2008

(Kathi Westphal)